

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология  
06.03.01.07 - Биофизика

Изменчивость и эволюция фермента фосфолипаза А<sub>2</sub>  
в яде ямкоголовых змей Старого Света

Руководитель \_\_\_\_\_ д.ф-м..н, профессор М.Г. Садовский

Выпускник \_\_\_\_\_ Д.Б. Тимофеева

Красноярск 2019



## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа «Изменчивость и эволюция фермента фосфолипаза А<sub>2</sub> в яде ямкоголовых змей Старого Света» содержит 40 страницы текстового документа, 30 использованных источника, 8 рисунков, 3 таблицы.

Целью работы состояла в выявлении и описании изменчивость PLA<sub>2</sub> у ямкоголовых змей Старого Света. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи: выбрать нуклеотидные последовательности PLA<sub>2</sub> из базы данных GenBank для изучаемых видов и сделать множественное выравнивание последовательностей, подобрать праймеры для PLA<sub>2</sub> и при помощи ПЦР и секвенирования получить последовательности для обыкновенного и гималайского щитомордников, описать изменчивость экзон – интронной структуры гена на основе множественного выравнивания, описать изменчивость ряда биофизических свойств фермента по аминокислотным последовательностям, а именно: гидрофобность, изоэлектрическая точка и молярная масса, построить филогенетическое дерево для визуализации эволюции фермента в изучаемой группе змей.

В работе выявлена и описана изменчивость PLA<sub>2</sub> у ямкоголовых змей Старого Света. Исследована экзон-интронная структура гена PLA<sub>2</sub>, которая оказалась консервативной для всех рассматриваемых видов. Установлено обособленное положение изоформ PLA<sub>2</sub> китайского щитомордника (*D. acutus*), гладкого щитомордника (*C. rhodostoma*) и гималайского щитомордника (*G. himalayanus*), а также присутствие более чем одной изоформы PLA<sub>2</sub> у большинства изученных видов.

ЭВОЛЮЦИЯ, ФЕРМЕНТЫ В ЯДЕ ЗМЕЙ, ФОСФОЛИПАЗА А<sub>2</sub>, ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНА.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ .....	1
ОГЛАВЛЕНИЕ .....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 Обзор литературы .....	7
1.1 Виды фосфолипаз.....	7
1.2 Фосфолипаза A <sub>2</sub> в змеином яде .....	11
1.3 Методы выделения ДНК .....	15
1.4 Методы выделения РНК.....	16
1.5 Использование ПЦР в молекулярной генетике .....	18
2 Материалы и методы .....	21
2.1 Материалы .....	21
2.2 Выделение РНК и ДНК.....	21
2.3 Определение концентрации ДНК и РНК спектрофотометром .....	22
2.4 Подбор праймеров.....	22
2.5 Полимеразная цепная реакция.....	22
2.6 Анализ последовательностей.....	23
3 Результаты и обсуждение.....	25
3.1 Интрон – экзонная структура гена PLA <sub>2</sub> .....	25
3.2 Аминокислотные замены в последовательностях .....	26
3.3 Биофизические свойства фермента PLA <sub>2</sub> .....	28
3.4 Сравнение значений биофизических свойств между родами .....	31
3.4 Реконструкция эволюции PLA <sub>2</sub> в рассматриваемой группе видов.....	33
ВЫВОДЫ.....	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	38

## ВВЕДЕНИЕ

Фосфолипазы - ферменты класса гидролаз, которые катализируют гидролиз фосфолипидов. В зависимости от положения гидролизуемой связи в фосфолипидах различают четыре основных класса фосфолипаз: А, В, С и D. Каждый класс фосфолипаз значительно отличаются по молекулярным массам, субъединичному составу и другим свойствам.

Фосфолипазы  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) содержатся в яде змей и имеют разную фармакологическую активность. В зависимости от замен в аминокислотной последовательности действие фермента может значительно измениться. Фосфолипазы этого класса, как и некоторые другие токсические компоненты змеиных ядов, являются объектом большого интереса со стороны фармакологии и медицины, поэтому представляют интерес процессы молекулярной эволюции, происходившей в этих белках и сформировавших их современное разнообразие, так как это может служить основой для получения искусственных соединений с нужными фармакологическими свойствами.

Целью работы было выявить и описать изменчивость PLA<sub>2</sub> у ямкоголовых змей Старого Света. Основными поставленными нами задачами были:

1. Выбрать нуклеотидные последовательности PLA<sub>2</sub> из базы данных GenBank для изучаемых видов и сделать множественное выравнивание последовательностей;
2. Подобрать праймеры для PLA<sub>2</sub> и при помощи ПЦР и секвенирования получить последовательности для обыкновенного и гималайского щитомордников;
3. Описать изменчивость экзон – интронной структуры гена на основе множественного выравнивания;

4. Описать изменчивость ряда биофизических свойств фермента по аминокислотным последовательностям, а именно: гидрофобность, изоэлектрическая точка и молярная масса;

5. Построить филогенетическое дерево для визуализации эволюции фермента в изучаемой группе змей.

Объектом наших исследований были нуклеотидные и аминокислотные последовательности PLA<sub>2</sub> яда ямкоголовых змей Старого Света, относящихся к следующим родам: гладкие щитомордники (*Calloselasma*), китайские щитомордники (*Dienagkistrodon*), щитомордники (*Gloydius*), горные гадюки (*Ovophis*) и куфии (*Trimeresurus* и *Protobothrops*).

# 1 Обзор литературы

## 1.1 Виды фосфолипаз

Различают несколько фосфолипаз группы А, чаще всего они являются составной частью многих тканей и секретов живых организмов. Кроме того, фосфолипаза является активным компонентом змеиного яда гемолитического действия.

Фосфолипаза  $A_1$  – внутриклеточные ферменты, часто мембраносвязанные, не нуждающиеся в коферменте (рис.1А.). Оптимальная каталитическая активность проявляется при рН 4,0 (лизосомальные ферменты) и 8,0 - 9,5 (ферменты микросом, плазматических мембран и цитозоля), распространены в животных тканях (например, печень, сердце, мозг), а также были обнаружены в микроорганизмах (например, кишечная палочка (*Escherichia coli*)) [1]. Ферменты этой группы отщепляют ацильную цепь фосфолипида в sn-1 положении.

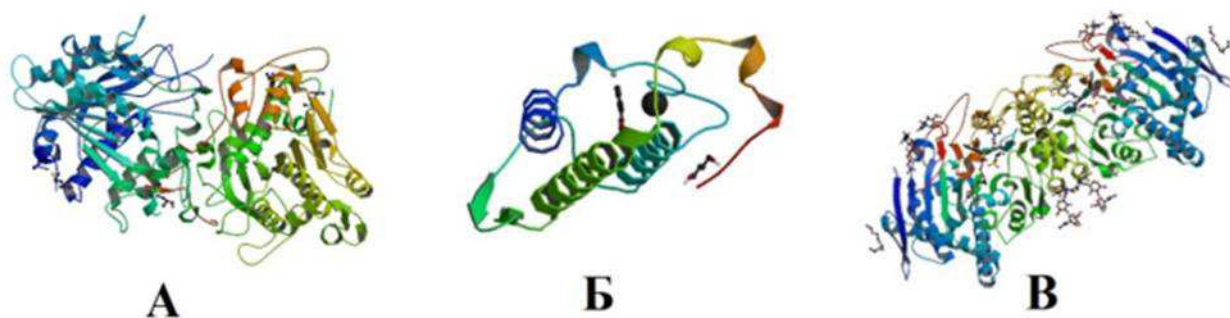


Рисунок 1 – Структура фосфолипаз: А - Кристаллическая структура Фосфолипазы  $A_1$ . Lee, I. 2011. Б - Кристаллическая структура Фосфолипазы  $A_2$ , выделенной из обыкновенного щитомордника (*Glycydium halys*). Zhao, H. 1998. В - Кристаллическая структура Фосфолипазы В, выделенной из клеток почки дикого быка. Pero, H. 2013

Фосфолипаза  $A_2$  – наиболее изученная группа фосфолипаз А. Внутриклеточные и секреторные ферменты, характеризующиеся низкой

молекулярной массой 13-18 кДа, наличием нескольких дисульфидных связей, потребностью в миллимолярном  $\text{Ca}^{2+}$  для оптимальной каталитической активности [2], а также низкой селективностью для фосфолипидов с различными полярными головками и жирными кислотами (рис.1Б.). Активный сайт этих ферментов имеет гистидиновый остаток. Ферменты этой группы отщепляют ацильную цепь фосфолипида в sn-2 положении. Змеиные яды содержат несколько основных токсичных компонентов, каждый из которых имеют свои изоформы [3]. На основе аминокислотной последовательности, трёхмерной структуры и дисульфидного склеивания ферменты этой группы разделяют на I и II группу, выделяют так же и III группу [4]: I Группа – обнаружена в поджелудочной железе млекопитающих и в ядах аспидовых (*Elapidae*) и ужеобразных (*Colubridae*). Обычно содержат 115-120 аминокислотных остатков с семью дисульфидными мостиками, а дисульфидная связь между одиннадцатым и семьдесят седьмым остатками цистеина (Cys) уникальна для этой группы. В ферментах млекопитающих имеется пять дополнительных удлинений аминокислотных остатков, которые называются петлёй поджелудочной железы. II Группа – ферменты яда гадюковых (*Viperidae*). Содержат 120-125 аминокислотных остатков и семь дисульфидных мостиков. У них отсутствует петля поджелудочной железы, а также отличаются от I группы расширенным хвостом C – конца. Уникальность ферментов этой группы состоит в том, что 133 цистеиновый остаток C – конца образует дисульфидную связь с 50 цистеиновым остатком вблизи активного сайта. Остальные шесть дисульфидных связей характерны как для I, так и для II группы (Cys27-Cys126, Cys29-Cys45, Cys44-Cys105, Cys51-Cys98, Cys61-Cys91 и Cys84-Cys96) [4]. Эту группу делят на шесть подгрупп на основе тканевой специфичной экспрессии:

1. ПА встречается в синовиальной жидкости человека, ядах гадюковых.
2. ПВ встречается в яде габонской гадюки (*Bitis gabonica*).
3. ПС встречается у крыс, мышей.



4. ПД встречается в поджелудочной железе человека, мыши, в селезенке.

5. ПЕ встречается в мозге человека, мыши (сердце, матке).

6. ПФ встречается у мышиногo эмбриона.

Ферменты II группы также могут быть разделены на разные подгруппы на основе аминокислотного остатка в сорок девятой позиции. Аспарагиновая кислота (Asp) в 49 позиции играет важную роль в катализе и сохраняется в большинстве ферментов PLA<sub>2</sub> яда змеи, и, следовательно, они идентифицированы как ферменты D49. Однако в некоторых из ферментов PLA<sub>2</sub> группы II этот аминокислотный остаток может быть заменён лизином (Lys) [5], при этой замене гидролитическая активность низкая или вообще отсутствует [6], серином (Ser), аспарагином (Asn) или аргинином (Arg), и они идентифицируются как K49, S49, N49 или R49, соответственно. Замещение аспарагиновой кислоты в сорок девятой позиции прерывает связывание кофактора Ca<sup>2+</sup> с контактирующей связью Ca<sup>2+</sup>, эти «мутанты» проявляют низкую гидролитическую активность или могут вообще ей не обладать, не обладают гемолитической активностью, но несмотря на это могут вызывать локальный отёк [6]. Кроме того, имеется несколько замещений в циклах связывания Ca<sup>2+</sup> - это мутантные ферменты.

Выделенная PLA<sub>2</sub> из яда жёлто-зелёной куфии (*P. flavoviridis*) были разделена на четыре типа на основе её первичной структуры и физиологической функции: нейтральные PLA<sub>2</sub>, аспарагиновая кислота в 49 позиции (pI около 7,9, высоколиполитические и миолитические); основные PLA<sub>2</sub>, аспарагиновая кислота в 49 позиции (pI около 8,6, вызывающие отёк); более основные PLA<sub>2</sub>, аспарагиновая кислота в 49 позиции (pI > 10, нейротоксический) и PLA<sub>2</sub>, лизин в 49 позиции (pI > 10, слабо липолитические, но сильно миолитический) [7].

Очищенная PLA<sub>2</sub> из яда гадюковых (*Viperidae*) является одной из самых токсичных фосфолипаз и имеет LD100 1–3 мкг на мышь весом 20 г [2].

III Группа. По своей структуре эта группа сильно отличается от I и II группы по структуре, но активный сайт очень похож [8]. Эта группа PLA<sub>2</sub> обнаружена в пчелиных ядах [7]. Пчелиные яды использовались в качестве анальгетиков на протяжении веков, особенно в восточной медицине [9], а также для лечения некоторых иммунных заболеваний, например, ревматоидного артрита. Недавно несколько клинических испытания показали, что пчелиный яд может быть полезным при лечении нейродегенеративных заболеваний, в том числе и болезни Паркинсона [10]. Фосфолипазу A<sub>2</sub> из яда пчёл (bvPLA<sub>2</sub>) можно разделить на три класса: внеклеточные или секретируемые (sPLA<sub>2</sub>, обычно присутствует в яде змей, пчел, книдарий и скорпионов), цитозольные или внутриклеточные (cPLA<sub>2</sub>) и Ca<sup>2+</sup> - зависимые. Пчелиные яды обладают широким спектром фармакологических свойств: активность против ВИЧ, миотоксичность и рост нейритов [10]. PLA<sub>2</sub> из яда индийского скорпиона (*Mesobuthus tamulus*) отличается тем, что показывает отсутствие классической водородной связи между кислотным остатком и каталитическим остатком гистидина (His) [8].

Фосфолипаза B – выделена из растений, микроорганизмов, яда пчел, тканей млекопитающих (рис.1 (B)). Ферменты этой группы крайне неспецифичны, катализируют гидролиз различных сложноэфирных связей, обладают литическим (разрушающим) действием по отношению к биологическим мембранами, что обуславливает их токсичность [11]. Они менее стабильны, чем фосфолипазы A, их оптимальная каталитическая активность проявляется при pH от 4,5 (лизосомальный фермент) до 10,0 (ферменты ядов), не имеют коферментов. Фосфолипаза B способна гидролизовать ацильную цепь фосфолипида в sn-1 и sn-2 положениях. Как правило, фосфолипаза действует на лизолецитин (лизофосфатидилхолин), образующийся в результате действия фосфолипазы A1 на лецитин (фосфатидилхолин) [12].

Фосфолипаза C обнаружена у бактерий *Clostridium*, *Bacillus* и *Pseudomonas*, а также в клетках млекопитающих (в клетках печени, мозга,

поджелудочной железы). Для некоторых из них характерна строгая специфичность по отношению к спиртовой группе молекулы субстрата, например, к остатку холина и миоинозита. Ионы  $Zn^{2+}$  являются для них коферментом и стабилизатором. Оптимальная каталитическая активность при pH около 7,0 [13]. Фосфолипаза С, гидролизующая фосфодиэфирную связь между глицериновым остатком фосфолипида и полярной фосфатной группой, относится к фосфодиэстеразам также, как и фосфолипаза D. Фосфолипаза С является ключевым ферментом метаболизма фосфатидилинозитола и липидных сигнальных путей. А также гидролизует фосфатидилинозитол (PIP2) на два вторичных медиатора инозитолтрифосфат (IP3) и диацилглицерин (DAG). Эти медиаторы вовлечены в последующие этапы сигнальных путей. В частности, они модулируют кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума и протеинкиназу С, соответственно [13].

Фосфолипаза D относится к группе важных ферментов, которые в живых системах выполняют разнообразные функции от усвоения питательных веществ до синтеза биологически активных соединений. Обнаружены в растениях (овощи, водоросли), микроорганизмах и в тканях животных. Оптимальная каталитическая активность при pH 4,7-8,0. Катионные ПАВ (поверхностно-активные вещества) ингибируют фосфолипазы D, анионные - активируют. Фосфолипаза D проявляет прежде всего гидролитическую активность, в результате которой происходит расщепление сложноэфирной связи между остатком фосфатидной кислоты и спирта в молекулах фосфолипидов. При этом последний замещается на водород, но возможен перенос остатка фосфатидной кислоты на самые разные гидроксилсодержащие акцепторы [14].

## **1.2 Фосфолипаза A<sub>2</sub> в змеином яде**

Фосфолипаза A<sub>2</sub> змеиного яда представляет собой небольшие белки (около 13-14 кДа) с 115-133 аминокислотными остатками. Они имеют четырнадцать консервативных остатков цистеина, которые образуют семь

дисульфидных мостов и стабилизированную третичную структуру [4]. Общие структуры групп I и II PLA<sub>2</sub> почти аналогичны, за исключением расширенного C-конца в группе II. Ферменты PLA<sub>2</sub> состоят из трёх основных α-спиралей и двух антипараллельных β-листов, которые связывают дисульфидные мостики. N-концевой сегмент ферментов PLA<sub>2</sub> имеет сохраняющуюся сеть водородных связей и стабилизирует соседние β-листы. Некоторые PLA<sub>2</sub> ферменты, которые сохраняют N-концевой пропептид (восьмимерный), не обладают каталитической активностью, аналогично предшественнику ферментов PLA<sub>2</sub> поджелудочной железы. Боковые цепи остатков в спирали образуют отверстие канала, особенно со второго, четвёртого, пятого и девятого остатка. Четвёртый остаток функционально важен, потому что он закрепляет N-концевую спираль фермента. Ca<sup>2+</sup> является наиболее важным кофактором для катализа. При катализе Ca<sup>2+</sup> связывается с ферментом при сохраняющемся цикле связывания Ca<sup>2+</sup>, который находится между остатками 25 и 33 с консенсусной последовательностью (Y25-G-C-Y / F-C-C-X-C-G33). Атом кислорода из Asp49 вместе с тремя карбонильными атомами кислорода (Y / F28, G30 и G32) и две молекулы воды образуют пятиугольную двупирамидную клетку для Ca<sup>2+</sup>. Две длинные спирали (от остатков от 37 до 54, называемые каталитическими спиралями, и от остатков 90-109) ориентированы антипараллельно и удерживаются вместе дисульфидными мостиками. Сохраняемые боковые цепи этих спиралей помогают в координации первичного Ca<sup>2+</sup> и образуют более глубокий контур гидрофобного канала. His48 является ключевым активным остатком сайта, который отвечает за катализ и поддерживается водородными связями от Trp52 до боковой цепи противоположной спирали (Asp99). Эта сеть, наряду с тесной связью Asp49 и His48, определяет геометрию активного сайта ферментов PLA<sub>2</sub>. Все ферменты PLA<sub>2</sub> имеют два различных β-листа которые образуют β-крыло. Это β-крыло соединяет основные спирали и выступает из основной структуры в растворитель [4].

Первыми выделенным в истории нейротоксином был кротоксин, дальнейшие исследования показали, что кротоксин это нековалентный комплекс между кислым и щелочным белком. PLA<sub>2</sub> – щелочной белок кротоксин В, образуют комплекс вместе с кротоксином А (кислый белок, не обладает токсичностью), в котором восстанавливается высокая токсичность и физико – химические свойства природного кротоксинового комплекса [15].

Ферменты PLA<sub>2</sub> змеиного яда обладают широким спектром фармакологических эффектов, но надо отметить что между этими фармакологическими эффектами и фосфолипазной активностью нет прямой взаимосвязи [2]. Большинство лишены прямой гемолитической активности, но при экзогенно добавленных фосфолипидах приобретают Y25-G-C-Y / F-C-C-X-C-G33 мощную гемолитическую активность, обусловленную продуктами гидролиза. Некоторые ферменты PLA<sub>2</sub> проявляют пресинаптическую (действуют на нервное окончание) и постсинаптическую (действуют на мышцы) активность. Многие могут вызывать миотоксичность, некоторые вызывают мионекроз, а некоторые системную миотоксичность. И в том и в другом случае происходит попадание креатинфосфокиназы в плазму жертвы, что ведёт за собой острое повреждение мышечных клеток, итогом которого является их гибель. Небольшое количество ферментов PLA<sub>2</sub> проявляет кардиотоксичность (точный механизм индукции не установлен). Так же известно, что данный фермент ингибирует свёртываемость крови. Эти антикоагулянты классифицируют на сильные, слабые и неантикоагулянтные, зависимо от дозы, необходимую для ингибирования свёртывания крови.

Фермент PLA<sub>2</sub> связывается с белками-мишенями через их специфические фармакологические сайты [4]:

1. Пресинаптический нейротоксический сайт

Анализ гидропатических профилей сорока одноцепочечных нейротоксических ферментов PLA<sub>2</sub> показал гидрофобный сегмент в области остатков 80-110. Но несколько из сорока семи не нейротоксических ферментов проявили схожую гидрофобность, что указывает на отсутствие корреляции

между нейротоксичностью и гидрофобностью. Был идентифицирован нейротоксический сайт в С-концевом сегменте. Исследования сайтов с мутациями показали, что Phe124 в С-конце является важным для нейротоксичности, потому что замена фенилаланина (Phe) (ароматическая) на изолейцин (Ile) (алифатическая) вызывала десятикратное снижение нейротоксичности.

## 2. Миотоксическая область

Миотоксичные ферменты имеют характерный катионный сайт, соответственно у не миотоксических ферментов этот сайт отсутствует. Этот катионный сайт расположен в аминоконцевой стороне гидрофобной спирали E, вместе гидрофобные и катионные участки образуют миотоксическую область.

## 3. Противомикробная область

Бактерицидная активность ферментов PLA<sub>2</sub> против грамположительных бактерий требует наличия анионных сайтов и последующего гидролиза фосфолипидной мембраны. В грамотрицательных бактериях, он требует синергетического действия белка, повышающего бактерицидную проницаемость, и зависит от гидролитической активности. Наличие кластера основных остатков на поверхности N-концевой спирали отвечает за бактерицидное действие ферментов PLA<sub>2</sub>.

## 4. Антикоагулянтная область

Было определено, что область антикоагулянтов находится между остатками 54 и 77, именно замена остатков в этой области показывает различие между сильной или слабой, или некоагулянтной PLA<sub>2</sub>. В основном этот регион положительно заряжен в сильном коагулянте и отрицательно заряжен в слабом или некоагулянтной PLA<sub>2</sub>.

PLA<sub>2</sub>, мешающую функциям тромбоцитов, делят на три класса. Класс А – ферменты PLA<sub>2</sub>, инициирующие агрегацию тромбоцитов, класс В – вызывают только ингибирование тромбоцитов, но не инициируют агрегацию, класс С – показывает двухфазные эффекты, при низкой

концентрации\коротком времени инкубации индуцируют агрегацию тромбоцитов, а при высокой концентрации\длительной инкубации ингибируют агрегацию тромбоцитов.

Свойство ферментов PLA<sub>2</sub> вызывать отёк обусловлено арахидоновой кислотой, высвобождаемой при гидролизе фосолипидов, которая превращается в простагландины и лейкотриены. Они приводят к сосудистой непроницаемости и образованию отёков в месте укуса змей.

### **1.3 Методы выделения ДНК**

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы:

1) Извлечение нуклеиновых кислот из содержащего их субстрата: разрушение и гомогенизация тканей, материалов, лизис клеток и т.д. Для этого используют лизирующие реагенты в сочетании с механическим воздействием – перемешиванием, перемалыванием, измельчением образца;

2) Удаление мембранных липидов с помощью детергентов и поверхностно-активных веществ, некоторые из которых задействованы и на предыдущем этапе;

3) Удаление белков при помощи протеаз;

4) Очистка ДНК от солей, белков, детергентов и других реагентов, задействованных на этапе клеточного лизиса. Наиболее распространенной являются процедура фенол-хлороформной экстракции, при которой белки из образца денатурируют в присутствии фенола. После центрифугирования образца белки остаются в осадке, а раствор, содержащий нуклеиновые кислоты, смешивается с хлороформом, который удаляет остатки фенола из раствора [16].

1. Фенол-хлороформный метод выделения ДНК («классический»).

Принцип выделения ДНК заключается в разделении фаз раствора ДНК и фенол-хлороформной смеси и удалении вместе фенольной и хлороформными фазами белков и полисахаридов. ДНК, выделенная фенол-хлороформным методом, готова к постановке ПЦР не сразу – нужно

подождать несколько часов, а лучше день, для наилучшего растворения осадка.

2. Наборы на колонках для выделения ДНК. Колонки представляют собой пробирки с силикагелевой мембраной, адсорбция на которой с последующей отмывкой оптимизированными буферами позволяет получить высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов и прочих нежелательных примесей. Для различных видов исходного материала подобраны подходящие лизирующие реагенты. Выделение в колонках, однако, имеет ограничение - этим методом сложно получить неповрежденные длинные молекулы ДНК, он рекомендуется для выделения молекул не более 50 тыс. пар нуклеотидов. Для анализа более крупных молекул подойдут наборы для выделения ДНК в растворе - более специализированные и сложные в использовании комплекты реагентов. Более мягкие условия выделения требуют больше времени, но позволяют получать препараты ДНК длиной до 150 тыс. пар нуклеотидов. Необходимость более тщательного подбора условий реакции обуславливает наличие специализированных наборов для работы с кровью, животными и растительными тканями.

3. Метод на основе магнитной сепарации. Использование магнитных твердых носителей в биохимических и молекулярно – биологических процессах имеет много преимуществ по сравнению с немагнитными сепарационными методами. Обычно магнит прикладывается к стенке сосуда, содержащего образец, чтобы частицы агрегировали у стенки сосуда, а остаток образца можно было убрать [17]. Таким способом можно отделять компоненты клеточного лизата, которые ингибируют ДНК-полимеразу и ПЦР-реакцию [18].

#### **1.4 Методы выделения РНК**

В зависимости от типа биологического материала лизис клеток осуществляется различными способами. Клетки биоматериала разрушаются различными способами, наиболее часто используемым из которых является



механическое разрушение. Часто (в случае работы с растительными и бактериальными клетками) возникает необходимость применения дополнительных компонентов для избавления от клеточной стенки (лизирующие ферменты, детергенты и т. д.) [19]. После разрушения образца возникает необходимость очистки от других компонентов клеток. Для этого существуют различные методы, основанные на специфических свойствах нуклеиновых кислот.

1. Метод выделения РНК с помощью тризола. Тризол — раствор, используемый для экстракции РНК, ДНК или белков, в соответствии с методикой Хомчинского [20]. Объем образца ткани не должен превышать 10% от объема фенола (примерно 50-100 мг на 1 мл тризола). Чем меньше ткани по отношению к тризолу, тем меньше будет примесь геномной ДНК. При большом количестве ткани следует соответственно увеличивать объем тризола. Во время гомогенизации ткани тризол одновременно поддерживает целостность РНК и способствует разрушению клеток и их компонентов.

2. Наборы для выделения РНК в центрифужных колонках. Этот метод принципиально аналогичен с методом выделения ДНК на центрифужных колонках.

Оценка качества выделенной ДНК и РНК на спектрофотометре определяется отношением поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм, показывая чистоту препарата ДНК или РНК. Препарат считается чистым, если отношение значений 260/280 нм приблизительно равно 1.8 для ДНК и 2.8 для РНК. В случае меньших значений показателя 260–280 нм препарат содержит большое количество примесей белка, фенола или иных агентов, имеющих значительное поглощение [19]. Другим показателем чистоты препарата ДНК или РНК является отношение значений поглощения 260–230 нм. В случае чистого препарата это соотношение обычно равно 1.8 – 2.2.

Для дальнейшего изучения ДНК и РНК необходимо увеличить их концентрацию методом полимеразной цепной реакции.

## 1.5 Использование ПЦР в молекулярной генетике

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод молекулярной биологии, который позволяет добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК, РНК) в биологическом материале. Открытие метода ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии, особенно бурное развитие этот метод получил благодаря международной программе «Геном человека» (международный научно-исследовательский проект, главной целью которого было определить последовательность нуклеотидов, которые составляют ДНК). Этот способ амплификации ДНК предложил Хелль Клеппе в 1971 году, но в то время эта идея осталась нереализованной [21].

Для работы метода ПЦР требуется наличие ряда компонентов [22]:

- Праймеры - искусственно синтезированные короткие (около 30 нуклеотидов) олигонуклеотиды, идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени;
- ДНК – полимеразы, этот фермент способен достраивать короткие олигонуклеотидные затравки (праймеры), присоединяя к 3'-концу цепи ДНК дополнительные нуклеотиды;
- Дезоксинуклеотидтрифосфаты – аденин, гуанин, цитозин и тимин, используются в качестве «строительного материала»;
- Буфер смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH;
- Ионы  $Mg^{2+}$  – необходимы для работы полимеразы;
- Вода;
- ДНК-матрица (сам образец) – содержащая, тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 температурных циклов, каждый из которых состоит из трёх стадий:

### 1. Денатурация.

Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96°C для разрыва водородных связей между комплементарными парами оснований, то есть переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую.

### 2. Отжиг.

Эта стадия, когда происходит присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени, для этого требуется понизить температуру до 50 – 65 °С (примерно, так как температура отжига зависит от состава праймеров). Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа.

### 3. Элонгация.

Температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы ДНК – полимеразы (72°C), которая с максимальной эффективностью начинает синтез второй цепи ДНК от 3'-конца праймера, связанного с матрицей, и движется в направлении от 3' к 5' концу.

Существует несколько основных способов детекции результатов ПЦР [22]:

1. Электрофоретический. В агарозном геле – метод горизонтального электрофореза. В этом случае детекцию результатов проводят в пластине агарозного геля, который представляет собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5-2,5% с добавлением специального красителя ДНК, например бромистого этидия. В полиакриламидном геле – метод вертикального электрофореза. Электрофорез в полиакриламидном геле имеет большую разрешающую способность по сравнению с агарозным электрофорезом и позволяет различать молекулы ДНК с точностью до одного нуклеотида.

2. Метод гибридизации после амплификации. Другой способ детекции продуктов амплификации основан на гибридизации олигонуклеотидных зондов с продуктами амплификации. Зонды

представляют собой искусственно синтезированные участки ДНК, содержащие ту или иную метку, детектируемую специальными приборами. Для детекции продуктов ПЦР после окончания реакции амплификации необходимо специальное оборудование – детектор флуоресценции. В процессе своей работы прибор регистрирует флуоресцентное излучение, возникающее в реакционной смеси при освещении образца источником возбуждающего света. Регистрация производится последовательно для каждой из пробирок при её позиционировании относительно оптического блока с помощью шагового двигателя.

3. Метод гибридизации в процессе амплификации. Ключевым элементом метода является использование гибридизационных олигонуклеотидных зондов, меченных молекулами флуорофора и «темнового» гасителя. Наиболее часто применяется флуоресцентный краситель 6-FAM (6-карбоксифлуоресцеин), с длиной волны возбуждения 488 нм, который легко связывается с олигонуклеотидами и обеспечивает высокую интенсивность сигнала. Поэтому под анализ с его использованием адаптированы многие приборы.

## 2 Материалы и методы

### 2.1 Материалы

При изучении изменчивости фосфолипазы A<sub>2</sub>, были собраны материалы по интересующим нас родам (*Calloselasma*, *Dienagkistrodon*, *Gloydius*, *Ovophis*, *Trimeresurus* и *Protobothrops*) относящимся к ямкоголовым змеям Старого Света. Все последовательности и данные о них были взяты из публичной базы данных GenBank (National Center for Biotechnology Information дата обращения 31.01.2018).

Образцы тканей двух экземпляров обыкновенного щитомордника (*Gloydius halys*) и одного экземпляра гималайского щитомордника (*G. himalayanus*) были использованы для выделения ДНК и РНК с целью получить нуклеотидные последовательности PLA<sub>2</sub> для этих видов. РНК выделялась из ядовитых желез, фиксированных в специальном буфере — RNA-later, тогда как ДНК выделялась из фрагментов брюшных щитков, фиксированных в спирте.

### 2.2 Выделение РНК и ДНК

Выделение РНК производилось по инструкции производителя реактивом ExtractRNA (Евроген) аналогичным по принципу действия реактиву Trizol.

Проверка результатов выделения проводилась при помощи геле-электрофореза. Для приготовления геля в специальную установку заливается нагретый раствор агарозы растворённой в 1% трис-ацетатном буфере с добавлением бромистого этидия. При заливке с помощью гребёнок в геле формируются лунки, в которые вносят выделенную РНК. Образцы раскапывались в лунки геля по 5 мкл. Электрофорез проводили в течение 10-15 минут. После завершения результаты смотрели на трансиллюминаторе и фотографировали.

Выделение ДНК производилось по инструкции производителя из набора БиоСилика (Россия). Результаты так же проверялись на гель-электрофорезе.

### **2.3 Определение концентрации ДНК и РНК спектрофотометром**

При постановке измерения образец ДНК разбавляют дистиллированной водой в 40 раз (к 5 мкл раствора ДНК добавляют 195 мкл воды). Измерение поглощения при 260 нм проводят в кювете с длиной оптического пути 1 мм, используя воду в качестве контроля. Значение концентрации ДНК в исходном растворе (мкг/мкл) находят, умножая значение поглощения при длине волны 260 нм на  $K = 20$ , где  $K$  – молекулярный коэффициент экстинкции.

РНК разбавляют водой в 10 раз (к 20 мкл раствора ДНК добавляют 180 мкл воды). Измерение поглощения при 260 нм проводят в кювете с длиной оптического пути 1 мм, используя воду в качестве контроля. Значение концентрации РНК в исходном растворе (мкг/мкл) находят, умножая значение поглощения при длине волны 260 нм на  $K = 4$ , где  $K$  – молекулярный коэффициент экстинкции).

### **2.4 Подбор праймеров**

Программа Primer-BLAST использовалась для подбора праймеров. В качестве основы для поиска праймеров использовались нуклеотидные последовательности близких видов из GenBank. Мы использовали следующие параметры при подборе праймеров: длина праймера 15-25 оснований, температура отжига от 53 до 65 °С, разница в температуре отжига между двумя праймерами в паре не более 5 градусов С, длина амплифицируемого фрагмента не более 1300 пн.

### **2.5 Полимеразная цепная реакция**

При постановке ПЦР в одной пробирке смешивались следующие компоненты (расчёт на одну реакцию): реакционная смесь 12,5 мкл (включающая в себя дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, ДНК – полимеразу,

ионы Mg<sup>+</sup> и буферный раствор), вода 9,5 мкл, два праймера по 0,5 мкл, и 2 мкл ДНК. Далее раскапываем в планшет и устанавливаем в амплификатор.

Метод градиентной ПЦР схож в своём действии с обычной, но при установке в амплификатор, на процесс отжига праймеров устанавливается линейный градиент с повышением температуры.

Проверка результатов ПЦР проводилась при помощи геле-электрофореза. Для приготовления геля в специальную камеру заливается нагретый раствор% агарозы растворённой в трис-ацетатном буфере (ТАЕ) с добавлением бромистого этидия. При заливке с помощью гребенок в геле формируют лунки, в которые вносят продукты амплификации. Образцы раскапывались в лунки геля по 5 мкл (если в реакционной смеси для ПЦР не было красителя – смешивается с 1 – 1,5 мкл красителя). Разделение продуктов ПЦР проводили в течение 10-15 минут. После завершения результаты визуализировали на трансиллюминаторе и фотографировали.

Очистка продуктов ПЦР для последующего секвенирования осуществлялась двумя разными методами: элюция из агарозного геля и непосредственная очистка из реакционной смеси. Элюция из агарозного геля производилось по инструкции из набора БиоСилика (Россия). Очистка из реакционных смесей производилось по инструкции производителя БиоСилика (Россия). Секвенирование осуществлялось в компании «Евроген».

## **2.6 Анализ последовательностей**

Нуклетидные последовательности выравнивались в программе MUSCLE [23] под управлением Seaview [24]. Затем выравнивание корректировалось вручную.

В полученном множественном выравнении нуклеотидных последовательностей была определена интрон – экзонная структура с использованием референсной аннотации. Для дальнейшего изучения интроны

удалялись, а полученные нуклеотидные последовательности транслировались в аминокислотные.

С помощью программы DAMBE - Data Analysis in Molecular Biology and Evolution [25] были вычислены значения гидрофобности, изоэлектрической точки и молярной массы аминокислотных последовательностей PLA<sub>2</sub>.

Для сравнения значений биофизических свойств между родами использовался критерий Краскела—Уоллиса. Это непараметрический статистический тест, который используется для сравнения двух или более независимых выборок равных или разных размеров. Согласно этому критерию существует две гипотезы: H<sub>0</sub> (нулевая гипотеза) состоит в том, что медианы всех групп равны, а H<sub>1</sub> (альтернативная гипотеза) заключается в том, что по крайней мере одна медиана одной группы неслучайно отличается от медианы по крайней мере одной другой группы. Значение *p* определяет достигнутый уровень значимости, то есть вероятность ошибочно отклонить нулевую гипотезу, чем меньше значение, тем сильнее аргументы против неё. В случае, если тест Краскела-Уоллиса обнаруживал значимое влияние фактора (в нашем случае — род змей), попарные сравнения между родами осуществлялись при помощи апостериорного критерия Данна.

Для визуализации эволюции фермента PLA<sub>2</sub> в изучаемой группе змей было построено филогенетическое дерево на основе выравненных аминокислотных последовательностей, с помощью программы PhyML (Stefan Guindon, 2003) [26] под управлением TOPALi v2.5 [27].



### 3 Результаты и обсуждение

#### 3.1 Интрон – экзонная структура гена PLA<sub>2</sub>

Экзон-интронная структура гена PLA<sub>2</sub> представлена на рис.2. Большую часть длины гена составляют интроны, самый длинный интрон второй – в среднем 696 нуклеотидов, при максимуме 720.

	5'конец	E1	I1	E2	I2	E3	I3	E4	3'конец
Ср:	284	39	241	132	696	100	260	142	161
Мин:	11	39	219	126	674	100	253	139	39
Макс:	555	39	255	132	720	100	261	148	748
Откл:	107	0	8	1	13	0	3	2	193

Рисунок 2 – Интрон –экзонная структура. 5' конец, 3' конец и интроны показаны чёрными линиями, а экзоны – красными фигурами.

Первый экзон – 39 нуклеотидов; второй экзон – в среднем 132 нуклеотид, минимальная длинна – 126, а максимальная – 132, третий экзон – длиной 100 нуклеотидов, и четвёртый, самый длинный экзон – 142 нуклеотида, максимальная длинна достигает 148, а минимальная 139 нуклеотидов. [4]

Выровненные аминокислотные последовательности делят на три основных участка (рис.3.):

- сигнальный пептид – аминокислотная последовательность белка, обеспечивающая посттрансляционный транспорт белка в органеллу (ядро, митохондрия, эндоплазматический ретикулум, хлоропласт, апопласт или пероксисома), удаляются вовремя транслокации секреторных белков через мембрану [28]. В наших последовательностях он состоит из пятнадцати аминокислот;
- Ca<sup>2+</sup> связывающий сайт. Так как фосфолипаза A<sub>2</sub> является Ca<sup>2+</sup> - зависимыми ферментами (активируются при миллимолярной концентрации

Ca<sup>2+</sup>), то этот сайт отвечает именно за это, состоит из одиннадцати аминокислот;

- активный центр - особая часть молекулы фермента, определяющая её специфичность и каталитическую активность, состоит из тринадцати аминокислот.

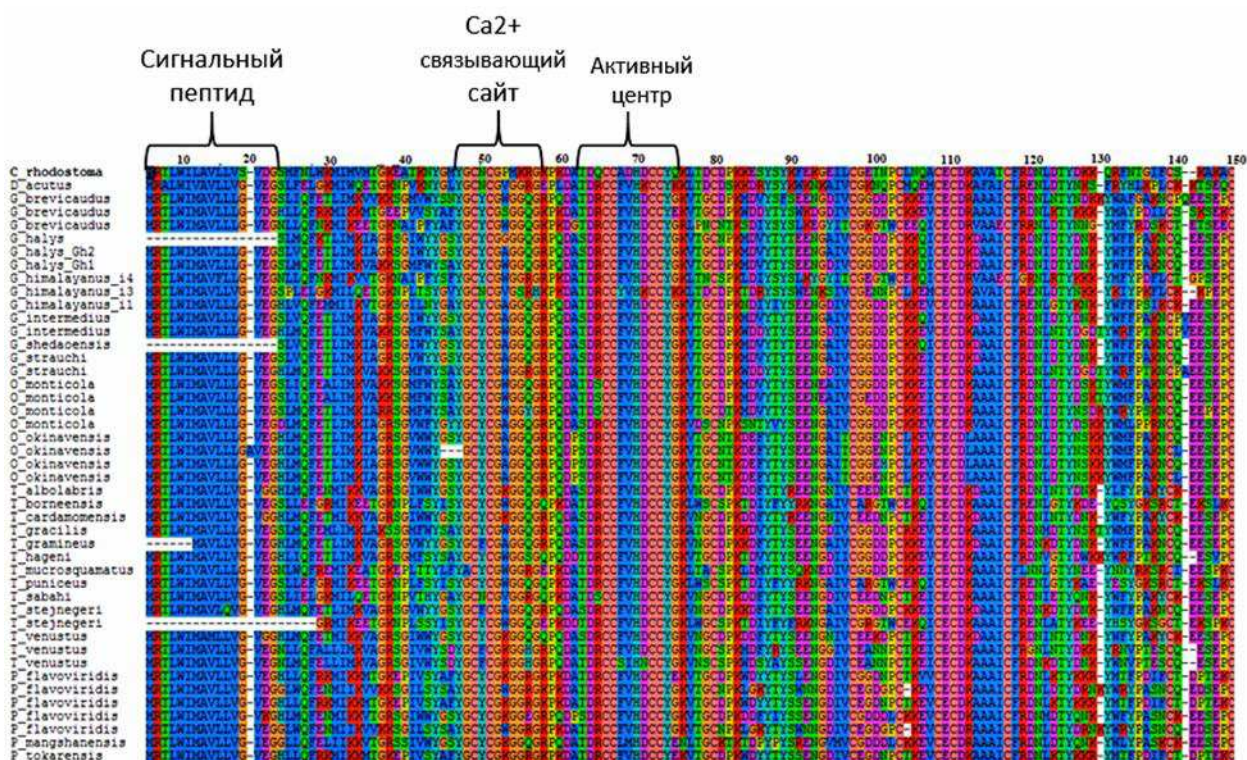


Рисунок 3 – Выровненные аминокислотные последовательности PLA<sub>2</sub>. Слева перечислены видовые названия, сверху указано расположение сигнального пептида, Ca<sup>2+</sup> связывающего сайта и активного центра.

### 3.2 Аминокислотные замены в последовательностях

На некоторые химические свойства ферментов змеиного яда, такие как гидролитическая и гемолитическая активность, может влиять изменение аминокислотной последовательности.

Первая замена обнаружена в 11 позиции сигнального пептида – лейцин заменён на глутамин у китайской куфии (*T. stejnegeri*). Следующая наблюдаемая замена – в позиции 13 сигнального пептида, у гладкого щитомордника (*C. rhodostoma*) глицин заменён на серин (рис. 4.).

Так же в сигнальном пептиде можно увидеть, что у окинавской куфии (*O. okinavensis*) есть аланин в 14 позиции, в то время как у других он отсутствует (рис. 4.).

В активном центре фермента фенилаланин заменён аланин у гладкого щитомордника (*C. rhodostoma*), на тирозин у гималайского щитомордника (*G. himalayanus\_i3*), на серин у великолепной куфии (*T. venustus*) и на лейцин у мангшаньской куфии (*P. mangshanensis*) в 62 позиции (рис. 4.).

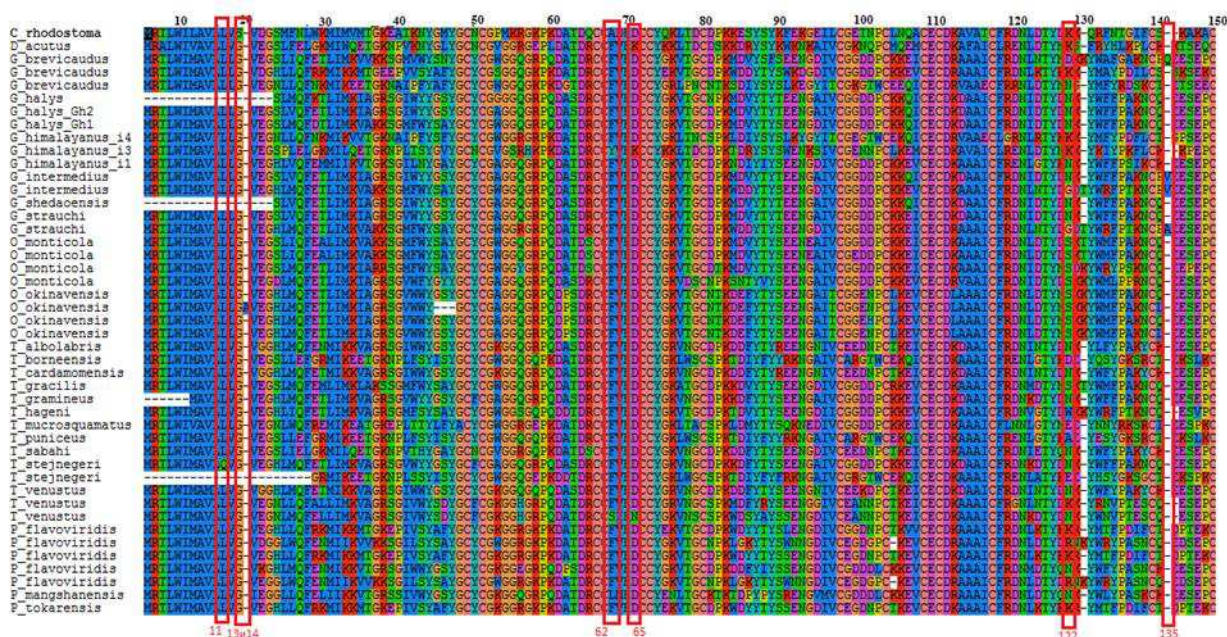


Рисунок 4 – Аминокислотное выравнивание PLA<sub>2</sub>. Слева указаны видовые названия. Замены в 11, 13, 14, 62, 65, 122 и 135 позиции выделены красным цветом.

В литературе достаточно много информации по замене в 65 позиции (но в литературе это 49 позиция, т. к. отсчёт идёт от сигнального пептида) активного центра PLA<sub>2</sub> (но в нашем выравнивании это замена в 65 позиции) [5, 6]. Среди изучаемых нами последовательностей было замечено три замены: аспарагиновая кислота была заменена на аспарагин у великолепной куфии (*T. venustus*) и на лизин у китайского щитомордника (*D. acutus*) и гималайского щитомордника (*G. himalayanus\_i3*) (рис. 4.).

Стоит обратить внимание, что в позиции 122 у двух видов, в последовательностях, принадлежащих к изоформе А – каменистого

щитомордника (*G. intermedius*) и тибетского щитомордника (*G. strauchi*) – у единственных есть глицин, в то время как у других видов в этой позиции может быть лизин, аспарагиновая кислота, аспарагин, серин и другие (рис. 4.).

Так же была отмечена вставка в 135 позиции – у каменистого щитомордника (*G. intermedius*) в этой позиции наблюдается валин, в то время как у короткохвостого щитомордника (*G. brevicaudus*) глутамин, а у тибетского щитомордника (*G. strauchi*) аланин, у всех других видов аминокислота в этой позиции отсутствует (рис. 4.).

### 3.3 Биофизические свойства фермента PLA<sub>2</sub>

Были определены такие биофизические свойства как: изоэлектрическая точка (рис.5.), показывающая кислотность среды (pH), при которой определённая молекула или поверхность не несёт электрического заряда, степень гидрофобности (рис.5.) и молекулярная масса (рис.5.).

Если значение степени гидрофобности\гидрофильности отрицательное – белок гидрофобный, соответственно, чем меньше значение, тем сильнее у белка выражены гидрофобные свойства. Так как фосфолипазы имеют гидрофобные, так и липофильные свойства, это объясняет не ярко выраженные гидрофобные свойства PLA<sub>2</sub>.

По литературным данным молекулярная масса PLA<sub>2</sub> примерно равна 13 – 15 кДа, среди изучаемых нами видов минимальная молекулярная масса равна 13,229 кДа у куфии штейнегера (*T. stejnegeri*), но у куфии штейнегера, относящейся к изоформе В, молекулярная масса относительно больше – 15,533 кДа, а максимальная – 16,083 кДа у короткохвостого щитомордника (*G. brevicaudus*).

Среднее значение изоэлектрической точки – 5,78. Стоит отметить, что у группы змей включающей виды: гладкий щитомордник, китайский щитомордник, короткохвостый щитомордник, два вида жёлто – зелёной куфии и гималайский щитомордник (*G. himalayanus\_i3* и *G. himalayanus\_i4*) имеются

изоформы PLA2 значения изоэлектрической точки которых резко отличается от среднего – около 8.

Таблица 1 – Значения молекулярной массы, изоэлектрической точки и гидрофобности изученных ферментов.

Вид	Молекулярная масса, кДа	pI	Значение гидрофобности
<i>C. rhodostoma</i>	15,485	8,160	-0,436
<i>D. acutus</i>	15,803	8,820	-0,428
<i>G. brevicaudus</i>	15,738	4,860	-0,299
<i>G. brevicaudus</i>	15,657	7,380	-0,386
<i>G. brevicaudus</i>	16,083	5,870	-0,448
<i>G. halys</i>	13,666	4,880	-0,525
<i>G_halys_Gh2</i>	15,434	4,600	-0,259
<i>G_halys_Gh1</i>	15,656	4,600	-0,330
<i>G_himalayanus_i4</i>	15,802	8,620	-0,150
<i>G_himalayanus_i3</i>	15,625	8,610	-0,471
<i>G_himalayanus_i1</i>	15,344	5,160	-0,183
<i>G. intermedius</i>	15,502	4,600	-0,214
<i>G. intermedius</i>	15,872	4,660	-0,394
<i>G. shedaoensis</i>	13,650	4,550	-0,484
<i>G. strauchi</i>	15,421	4,550	-0,262
<i>G. strauchi</i>	15,914	4,760	-0,420
<i>O. monticola</i>	15,596	4,560	-0,208
<i>O. monticola</i>	15,761	4,730	-0,322
<i>O. monticola</i>	15,628	4,730	-0,301
<i>O. okinavensis</i>	15,598	4,850	-0,267
<i>O. okinavensis</i>	15,347	4,850	-0,186

Вид	Молекулярная масса, кДа	pI	Значение гидрофобности
<i>O. okinavensis</i>	15,621	4,980	-0,265
<i>O. okinavensis</i>	15,583	4,850	-0,214
<i>T. albolabris</i>	15,803	5,020	-0,529
<i>T. borneensis</i>	15,742	8,350	-0,310
<i>T. cardamomensis</i>	15,863	5,020	-0,543
<i>T. gracilis</i>	15,688	4,730	-0,328
<i>T. gramineus</i>	14,717	4,740	-0,448
<i>T. hageni</i>	15,456	4,930	-0,275
<i>T. mucrosquamatus</i>	15,739	5,240	-0,392
<i>T. puniceus</i>	15,699	8,350	-0,272
<i>T. sabahi</i>	15,464	4,560	-0,423
<i>T. stejneri</i>	15,533	4,860	-0,452
<i>T. stejneri</i>	13,229	7,940	-0,667
<i>T. venustus</i>	15,812	4,880	-0,528
<i>T. venustus</i>	15,280	6,100	-0,225
<i>T. venustus</i>	15,327	4,950	-0,353
<i>P. flavoviridis</i>	15,729	8,340	-0,278
<i>P. flavoviridis</i>	15,534	6,530	-0,363
<i>P. flavoviridis</i>	15,733	8,150	-0,367
<i>P. flavoviridis</i>	15,707	4,990	-0,460
<i>P. flavoviridis</i>	15,548	6,530	-0,363
<i>P. mangshanensis</i>	15,603	5,440	-0,350
<i>P. tokarensis</i>	15,805	7,870	-0,390
Среднее значение:	15,477	5,784	-0,356
Стандартное отклонение:	0,575	1,494	0,114

Данную таблицу можно представить в виде графиков (рис. 5.).

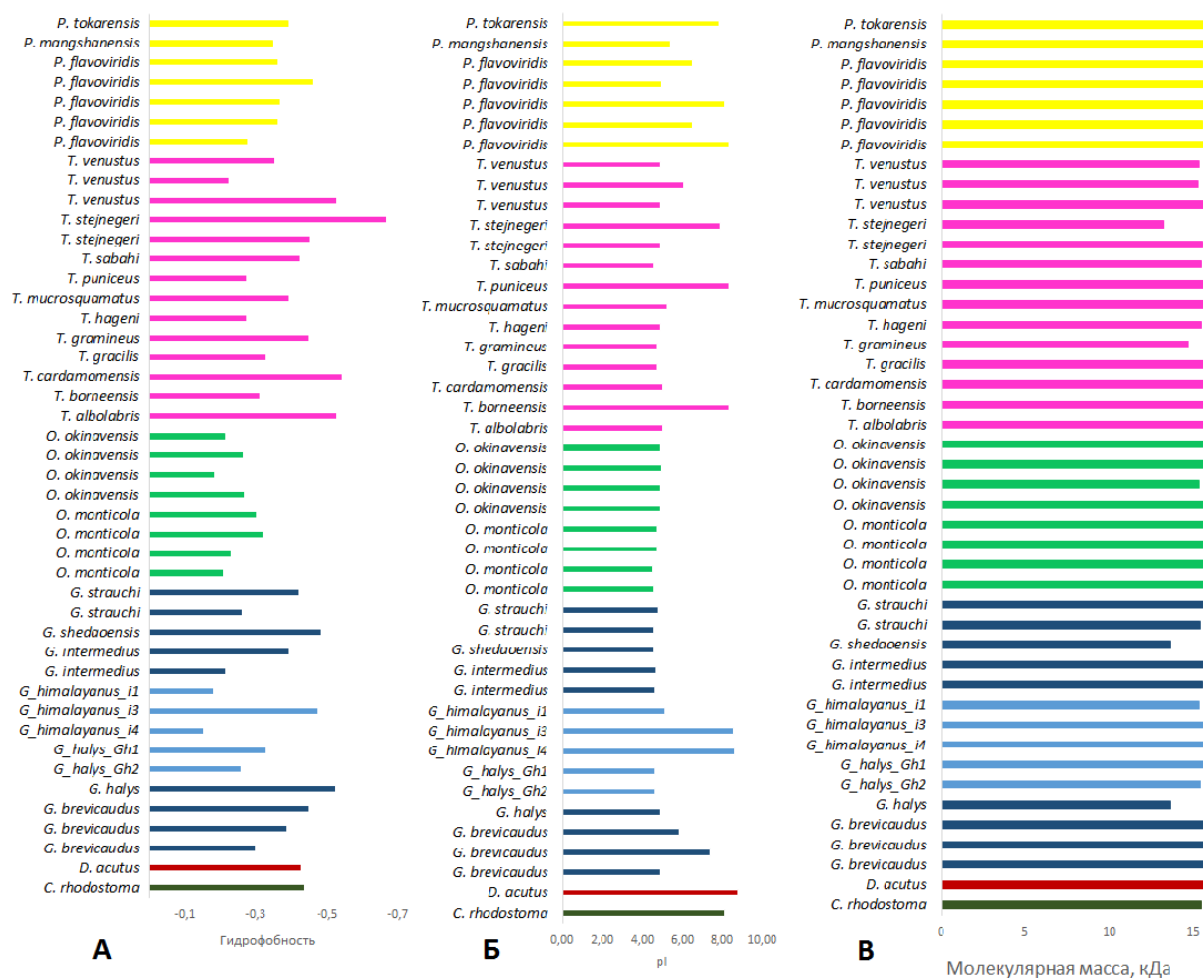


Рисунок 5 - А - значение гидрофобности, Б -изоэлектрическая точка фермента, В – молекулярная масса изученного фермента.

### 3.4 Сравнение значений биофизических свойств между родами

При сравнении родов (*Gloydus*, *Oviphis*, *Trimeresurus*, *Protobothrops*) по значениям молекулярной массы, не было обнаружено статистически достоверных отличий (тест Краскела – Уоллиса:  $H = 0,762$ ,  $p = 0,8586$ ).

При сравнении по изоэлектрической точке фермента обнаружены достоверные различия между медианами выборок (тест Краскела – Уоллиса:  $H = 11,950$ ,  $p = 0.0075$ ). При попарном сравнении достоверные отличия выявлены между *Protobothrops* и *Gloydus*, *Protobothrops* и *Oviphis*, *Trimeresurus* и *Oviphis* (Рис.6, Таблица 2).

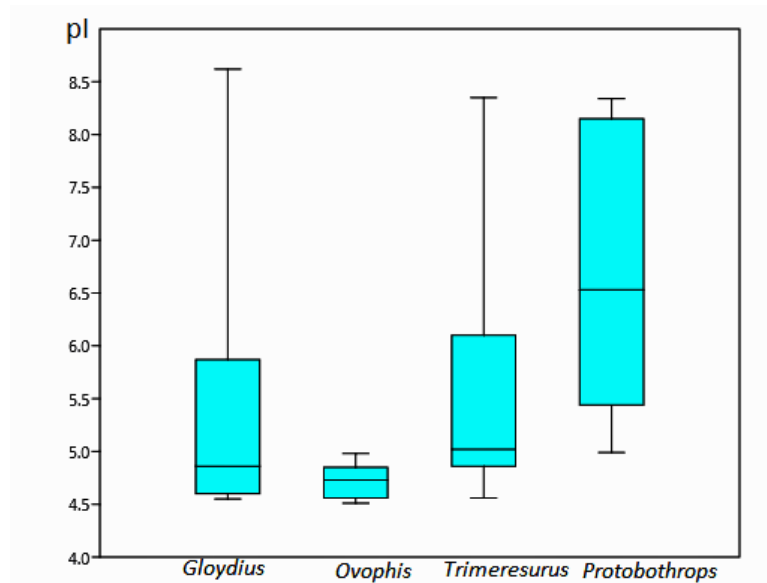


Рисунок 6 – Диаграмма размахов значений изоэлектрической точки фермента в сравниваемых родах змей.

Таблица 2 – Парные сравнения родов по изоэлектрической точке. Под диагональю — значения критерия критерия Данна (z), над диагональю — статистическая достоверность (p).

Род	<i>Gloydius</i>	<i>Ovophis</i>	<i>Trimeresurus</i>	<i>Protobothrops</i>
<i>Gloydius</i>	-	0,232	0,243	0,012
<i>Ovophis</i>	1,193	-	0,028	0,001
<i>Trimeresurus</i>	1,167	2,188	-	0,122
<i>Protobothrops</i>	2,496	3,254	1,543	-

При сравнении гидрофобности фермента для родов существуют значительные различия между медианами выборки (тест Краскела – Уоллиса показал значение  $H = 10,93$ , значение  $p = 0,0120$ ) (рис. 8.). При попарном сравнении достоверные отличия выявлены между родом *Ovophis* и всеми остальными родами, тогда как между другими родами достоверные отличия отсутствуют (Рис.7, Таблица 3).



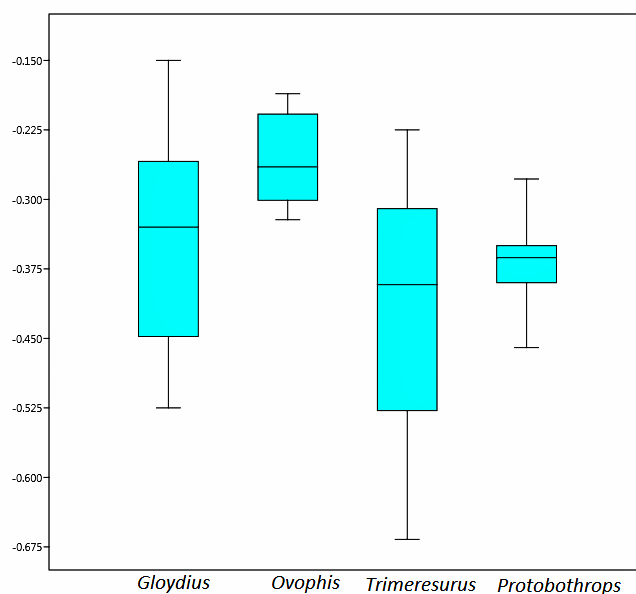


Рисунок 7 – Диаграмма размахов значений гидрофобности фермента в сравниваемых родах змей.

Таблица 3 – Парные сравнения родов по значению гидрофобности фермента. Под диагональю — значения критерия критерия Данна (z), над диагональю — статистическая достоверность (p).

Род	<i>Gloydius</i>	<i>Ovophis</i>	<i>Trimeresurus</i>	<i>Protobothrops</i>
<i>Gloydius</i>	-	0,038	0,173	0,522
<i>Ovophis</i>	2,065	-	0,001	0,019
<i>Trimeresurus</i>	1,362	3,227	-	0,636
<i>Protobothrops</i>	0,639	2,342	0,473	-

### 3.4 Реконструкция эволюции PLA<sub>2</sub> в рассматриваемой группе видов

У змей имеются дублицированные гены, кодирующие разные изоформы PLA<sub>2</sub>, экспрессируемые в ядовитой железе [9], поэтому следующим шагом работы было построить филогенетическое дерево по максимальному правдоподобию (рис.8.), при помощи которого можно визуализировать эволюционные отношения между изоформами, а также соответствие между изменчивостью фосфолипаз и родственными отношениями между видами.

На основе литературных данных о изоформе А у видов тибетского щитомордника (*G. strauchi*) и каменистого щитомордника (*G. intermedius*), а так же о изоформе В у тех же видов, можно сделать предположение (на основании сходства), что группа ферментов, выделенная в красную рамку, относится к изоформе А, а группа, выделенная зелёной рамкой, относится к изоформе В.

Так же стоит отметить удаленное положение фосфолипаз видов китайского щитомордника (*D. acutus*), гладкого щитомордника (*C. rhodostoma*) и гималайского щитомордника (*G. himalayanus\_i3*), что может говорить об обособленном пути эволюции PLA<sub>2</sub> у общего предка этих видов.

В настоящее время предполагается, что в процессе эволюции белков аминокислотные замены, производящие относительно небольшие физико – химические изменения, встречаются гораздо чаще, чем те, которые связаны с относительно большими изменениями, т. е. аминокислотные замены консервативны [30].

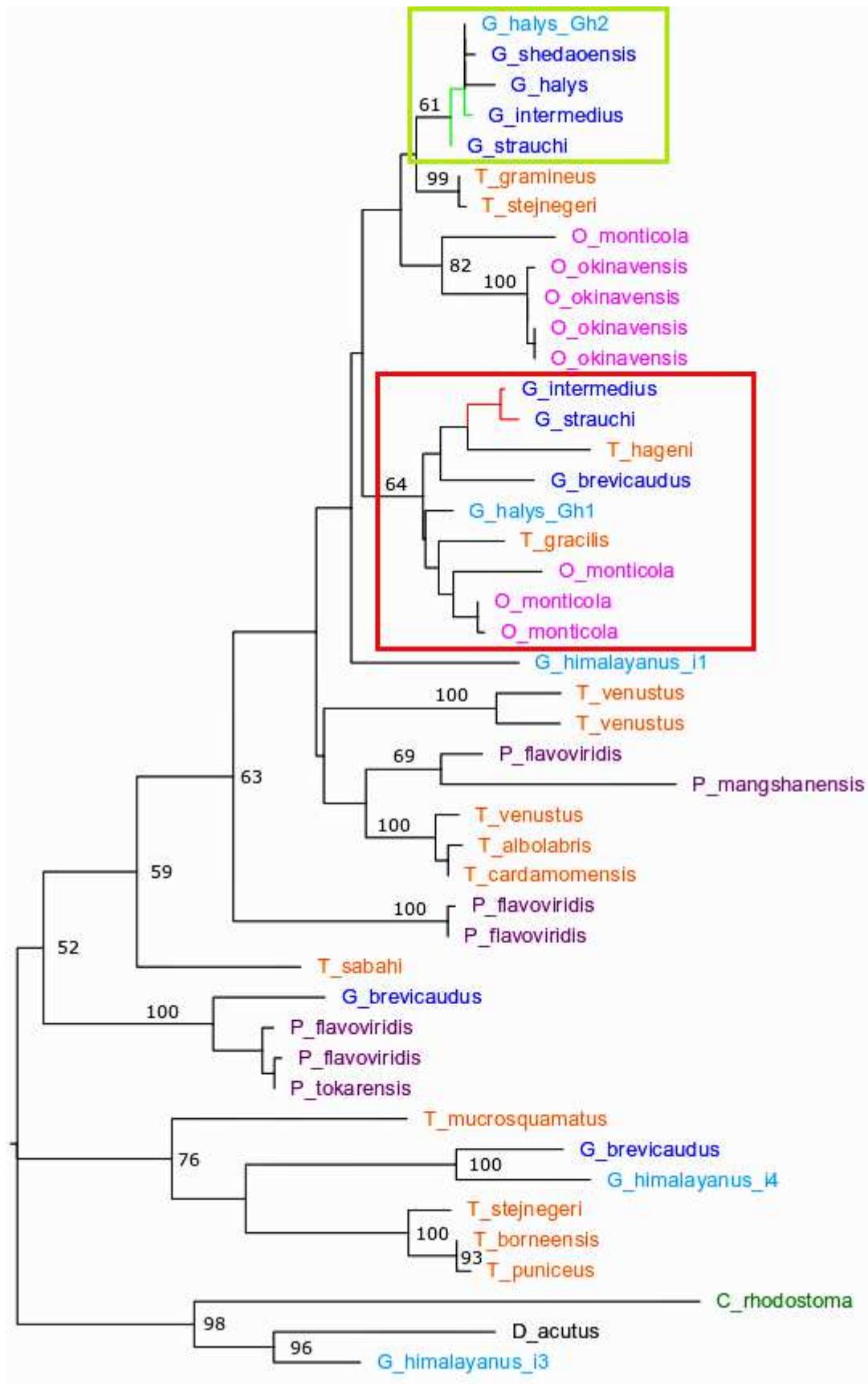


Рисунок 8 – Филогенетическое дерево визуализирующее эволюцию изучаемого фермента. Виды выделены цветом по родам, ветви, окрашенные в цвет, отображают наличие изоформы (красным цветом – изоформа А, зелёным цветом – изоформа В). Цифры в узлах – значения поддержки бустреп.

## ВЫВОДЫ

1. Общее количество нуклеотидных последовательностей PLA<sub>2</sub>, выбранных из базы данных GenBank для изучаемых видов, составило 40, которые содержали в себе 25 видов змей.

2. Была создана рабочая система праймеров для амплификации гена PLA<sub>2</sub> у щитомордников рода *Gloydius* для последующего изучения изменчивости по этому гену.

3. Экзон-интронная структура гена PLA<sub>2</sub> оказалась консервативной для всех рассматриваемых видов – четыре экзона и три интрона, при этом их размеры варьируют незначительно.

4. Молекулярная масса изменяется в пределах от 13,229 до 16,083 кДа. Значение гидрофобности изменяется в пределах от -0,667 до -0,15. Значения изоэлектрической точки изменяются от 4,51 до 8,82. При этом выявлены межродовые отличия по значениям гидрофобности и изоэлектрической точки.

5. Филогенетическое дерево показало обособленное положение изоформ PLA<sub>2</sub> китайского щитомордника (*D. acutus*), гладкого щитомордника (*C. rhodostoma*) и гималайского щитомордника (*G. himalayanus*), а также присутствие более чем одной изоформы PLA<sub>2</sub> у большинства изученных видов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлена и описана изменчивость PLA<sub>2</sub> у ямкоголовых змей Старого Света. Исследована экзон-интронная структура гена PLA<sub>2</sub>, которая оказалась консервативной для всех рассматриваемых видов. Установлено обособленное положение изоформ PLA<sub>2</sub> китайского щитомордника (*D. acutus*), гладкого щитомордника (*C. rhodostoma*) и гималайского щитомордника (*G. himalayanus*), а также присутствие более чем одной изоформы PLA<sub>2</sub> у большинства изученных видов.

В целом, изучение молекулярной эволюции является перспективным направлением для теоретической основы для получения искусственных соединений с нужными фармакологическими свойствами, а также важно само понимание процесса эволюции, которая сформировала их современное разнообразие.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Bakholdina S. I. Recombinant Phospholipase A1 of the Outer Membrane of Psychrotrophic *Yersinia pseudotuberculosis*: Expression, Purification, and Characterization / S. I. Bakholdina, N. M. Tischenko, E. V. Sidorin, M. P. Isaeva, G. N. Likhatskaya, P. S. Dmitrenok, N. Yu. Kim, O. V. Chernikov, and T. F. Solov'eva // *Biochemistry*. – 2016. – V. 81. – P. 47 – 57.
2. Атанасов В.Н. Изучение гемолитических и антикоагулянтных свойств нейротоксина випоксина и его компонентов – позитивно заряженной фосфолипазы a2 и ее негативно заряженного ингибитора / В.Н. Атанасов, Д. Данчев, М. Митева, С. Петрова // *Биохимия*. – 2009 – Т. 74 – №3. – 339 – 345 с.
3. Chijiwa T. Amino acid sequence of a basic aspartate-49-phospholipase A2 from *Trimeresurus flavoviridis* venom and phylogenetic analysis of Crotalinae venom phospholipases A2 / Takahito Chijiwa, Kazuki Abe, Tomohisa Ogawa, Nikolai N. Nikandrov, Shosaku Hattori, Naoko Oda-Ueda, Motonori Ohno // *Toxicon*. – 2005. – 46. – P. 185 – 195.
4. Mackessy S. P. Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles / Stephen P. Mackessy // Boca Raton. – CRC Press, Taylor & Francis Group. – 2010. – P.521.
5. Chijiwa T. Structural Characteristics and Evolution of a Novel Venom Phospholipase A2 Gene from *Protobothrops flavoviridis* / Takahito Chigiwa, Naoki Ikeda, Haruna Masuda, Hiroaki Hara, Naoko Oda – Ueda, Shosaku Hattori, Motonori Ohno // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2012. – 76 (3). – P. 551–558.
6. Wei J. N49 phospholipase A<sub>2</sub>, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A<sub>2</sub>/ Ji-Fu Wei, Xiao-long Wei, Qiu-Yu Chen, Tian Huang, Li-Ya Qiao, Wan-Yu Wang, Yu-Liang Xiong, Shao-Heng He // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2006. – 1760. – P. 462–471.
7. Chijiwa T. Structural Characteristics and Evolution of the *Protobothrops elegans* Pancreatic Phospholipase A2 Gene in Contrast with Those of *Protobothrops Genus* Venom Phospholipase A2 Genes / Takahito Chigiwa,

Hideto Nakasone, Sakiko Irie, Naoki Ikeda, Kantaro Tomoda, Naoko Oda – Ueda, Shosaku Hattori, Motonori Ohno // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2013. – 77 (1). – 97–102 c.

8. Hariprasad G. Structural analysis of a group III Glu62-phospholipase A2 from the scorpion, *Mesobuthus tamulus*: Targeting and reversible inhibition by native peptides / Gururao Hariprasad, Manoj Kumar, Alagiri Srinivasan, Punit Kaur, Tej Pal Singh, Othayoth Jithesh // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2011. – 48. – P. 423 – 431.

9. Zambelli V. O. Secreted Phospholipases A2 from Animal Venoms in Pain and Analgesia / Vanessa O. Zambelli, Gisele Picolo, Carlos A. H. Fernandes, Marcos R. M., Yara Cury // *Toxins*. – 2017. – 9. – P. 406.

10. Ye M. Bee venom phospholipase A2 ameliorates motor dysfunction and modulates microglia activation in Parkinson's disease alpha – synuclein transgenic mice / Minsook Ye, Hwan – Suck Chung, Chanju Lee, Joo Hyun Song, Insop Shim, Youn – Sub Kim, Hyunsu Bae // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2016. – 48.

11. Huang S. Characteristics and vegetable oils degumming of recombinant phospholipase B / Shen Huang, Meili Liang //, Yinghua Xu, Aamir Rasool, Chun Li // *Chemical Engineering Journal*. – 2014. – V.237. – P. 23 – 28.

12. Morgan C. P. Identification of phospholipase B from *Dictyostelium discoideum* reveals a new lipase family present in mammals, flies and nematodes, but not yeast / Clive P. Morgan, Robert Insall, Lee Haynes, Shamshad Cockcroft // *Biochem*. – 2004. – V. 382. – P. 441–449.

13. Essen L. Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C / O. Essen, Perisic, O., Cheung, R., Katan, M., R. L. Williams // *Nature*. – 1996. – V. 380. – P. 595–602.

14. Rochelle K. N. Physiological and pathophysiological roles for phospholipase D / Rochelle K. Nelson, Michael A. Frohman // *Journal of Lipid Research*. – 2015. – V. 56. – P. 2229 – 2237.

15. Орлов Б. Н. Зоотоксикология (ядовитые животные и их яды) / Б. Н. Орлов, Д. Б. Гелашвили // Учебное пособие. – Москва. – 1985. – 280 с.
16. Великов В.А. Молекулярная биология / Великов Владимир Александрович // Учебно-методическое пособие. – Саратов. – 2013. – УДК 577.21.
17. Антонова О. С. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии / О. С. Антонова, Н. А. Корнева, Ю. В. Белов, В. Е. Курочкин // Научное приборостроение. – 2010. – 20. – 1.
18. Clin J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids / R. Boom, C.J. Sol, M.M. Salimans // Microbiol. – 1990. – 28. – 495–503.
19. Епринцев А.Т. Идентификация и исследование экспрессии генов / Еприцев Александр Трофимович, Попов Василий Николаевич, Федорин Дмитрий Николаевич // Учебно-методическое пособие. – Воронеж. – 2008.
20. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Analytical Biochemistry. – 1987. – 162. – 1.
21. Kleppe K. Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases / K.Kleppe, E.Ohtsuka, R.Kleppe, I.Molineux, H.G.Khorana // Journal of Molecular Biology. – 1971. – 56. – 2. – P. 341-361
22. Зорина В. В. Основы полимеразной цепной реакции / Виктория Владимировна Зорина // Методическое пособие. – 2012. – 76с.
23. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput / Robert C. Edgar // Nucleic Acids Research. – 2004. – V. 32.

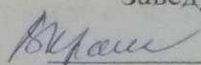


24. Gouy M. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building / Gouy M., Guindon S. Gascuel O. // *Molecular Biology and Evolution*. – 2010. – V. 27. – P. 221-224.
25. Xia X. DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution / X. Xia, Z. Xie // *The Journal of Heredity*. – 2001. – V. 92.
26. Guindon S. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0 / Stephane Guindon, Jean-Francois Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijki, Oliver Gascuel // *SYSTEMATIC BIOLOGY*. – 2010. – V. 59. – P. 307–321.
27. Milne I. TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops / Iain Milne, Dominik Lindner, Micha Bayer, Dirk Husmeier, Gráinne McGuire, David F. Marshall, Frank Wright // *BIOINFORMATICS*. – 2009. – V. 25. - P. 126–127.
28. Coleman J. Dual Functions of the Signal Peptide in Protein Transfer Across the Membrane / Jack Coleman, Masatoshi Inukai, Masayori Inouye // *Cell*. – 1985. – V. 43. – P. 351-360.
29. Fernández M. L. Intravascular hemolysis induced by phospholipases A2 from the venom of the Eastern coral snake, *Micrurus fulvius*: functional profiles of hemolytic and non-hemolytic isoforms / María Laura Fernández, Pablo Yunes Quartino, Ruth Arce-Bejarano, Julián Fernández, Luis F. Camacho, José María Gutiérrez, Daniel Kuemmel, Gerardo Fidelio, Bruno Lomonte // *Toxicology Letters*. – 2017. – P. 26-35
30. Miyata T. Two Types of Amino Acid Substitutions in Protein Evolution / Takashi Miyata, Sanzo Miyazawa, Teruo Yasunaga // *Journal of Molecular Evolution*. – 1979. – 12. – P. 219 – 236

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 В.А. Кратасюк

« 20 » июня 2019 г.

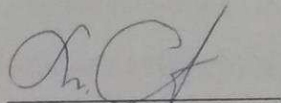
БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

06.03.01.07 – Биофизика

Изменчивость и эволюция фермента фосфолипаза  $A_2$   
в яде ямкоголовых змей Старого Света

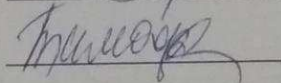
Руководитель



д.ф.-м.н., профессор

М. Г., Садовский

Выпускник



Д. Б. Тимофеева

Красноярск 2019