

УДК 577.2

## ГЕНЫ $\beta$ -actin И 36B4 У МЯГКОГО КОРАЛЛА *Sclerophytum heterospiculatum* (Verseveldt, 1970)

© 2025 г. Е. Т. Бизикашвили<sup>1</sup>, \*, Е. В. Шамшурина<sup>1</sup>, Т. В. Сикорская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения  
Российской академии наук, Владивосток, 690041 Россия

\*e-mail: bilielena801@gmail.com

Поступила в редакцию 29.09.2024 г.

После доработки 16.10.2024 г.

Принята к публикации 23.10.2024 г.

Коралловые полипы являются объектом для различных исследований, в том числе в области молекулярной биологии. На данный момент большое внимание уделяется молекулярным исследованиям кораллов подкласса Hexacorallia. Для этой цели мы установили и охарактеризовали последовательности генов  $\beta$ -actin и 36B4 из мягкого коралла *Sclerophytum heterospiculatum* (Verseveldt, 1970). Гены 36B4 и  $\beta$ -actin необходимы для нормального функционирования клеток, отличаются высокой консервативностью между таксонами, что подтверждается филогенетическим деревом, полученным в этой работе.

**Ключевые слова:** Cnidaria, Octocorallia, актин, RPLP0, 36B4.

**DOI:** 10.31857/S0016675825020101 **EDN:** UUZOWT

Мягкие кораллы (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia) являются одним из доминирующих видов кораллового рифа. Октотокораллы повсеместно распространены в мировом океане и встречаются от арктических до тропических вод на различных глубинах [1]. Большая часть видов этого разнообразного таксона состоит в симбиотических отношениях с динофлагеллятами (Alveolata: Myzozoa: Dinoflagellata). Род *Sclerophytum* относится к числу наиболее распространенных симбиотических мягких кораллов из отряда Malacalcyonacea. Виды рода *Sclerophytum* встречаются в большом количестве в Индо-Тихоокеанском регионе и часто являются доминирующими видами и конкурентами твердых кораллов (Cnidaria: Anthozoa: Hexacorallia) [2, 3]. Быстрые темпы изменения температуры мирового океана, вызванные антропогенными факторами, в настоящее время представляют серьезную угрозу для экосистем коралловых рифов [4]. Основным последствием повышения температуры морской воды является обесцвечивание кораллов. Т. Сикорская и Е. Ермоленко [5] установили, что при обесцвечивании *S. heterospiculatum* происходит перестройка профиля молекулярных видов структурных липидов, при которой снижается содержание фосфолипидов с простой эфирной связью (этерных фосфолипидов). Подобные изменения в составе фосфолипидов могут быть связаны с нарушением биосинтеза этерных фосфолипидов. Несмотря на то, что на данный момент известен ряд

белков, участвующих в биосинтезе этерных фосфолипидов у коралловых полипов [6], работ по изучению экспрессии генов данных белков в процессе обесцвечивания практически нет.

Как известно, при исследовании экспрессии генов количественное определение транскриптов матричной РНК (мРНК) зависит от различий в количестве исходного материала между образцами. Одной из стратегий для решения этой проблемы является одновременная амплификация с референсным геном, на который не влияют используемые экспериментальные условия [7]. Как правило, в качестве референсных генов выбирают гены домашнего хозяйства, которые экспрессируются на стабильном уровне [8]. В настоящее время в качестве референсных генов коралловых полипов чаще всего используются 18S, 36B4 и  $\beta$ -актин. Так как для *Sclerophytum heterospiculatum* нуклеотидные последовательности референсных генов отсутствуют, нами в настоящем исследовании предпринята попытка установить последовательности генов  $\beta$ -актина и 36B4 у данного вида мягкого коралла.

Коралловые полипы были собраны возле о. Окинава, Япония. Коралловые колонии октотокораллов *S. heterospiculatum* (Verseveldt, 1970) выращивали в резервуаре емкостью 500 л с аэрированной морской водой, подключенной к общей проточной циркуляционной системе (морская вода поступает из залива Петра Великого, Россия, в

северо-западной части Японского моря). Колонии кораллов выращивали до высоты 10 см в течение одного года при температуре 27°C. Колонии освещали белыми люминесцентными лампами (National, FL20SS-N/18) с плотностью потока фотосинтетических фотонов 200 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>. Фотопериод составлял 12 ч света/12 ч темноты.

Суммарную РНК выделяли из 200 ± 2 mg ткани коралла с помощью набора ExtractRNA (Евроген, Россия). Определение концентрации и чистоты РНК проводили с помощью спектрофотометра NanoDrop OneC (Thermo Scientific, США). кДНК синтезировали согласно протоколу производителя, используя набор реактивов для синтеза кДНК Mint-2 kit cDNA (Евроген, Россия).

Вырожденные олигонуклеотиды для ПЦР  $\beta$ -актин и 36B4 разработали на основе гомологичных белковых последовательностей других коралловых полипов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Условия ПЦР: предварительная денатурация при 95°C в течение 2 мин; 34 цикла амплификации, состоящие из денатурации при 95°C в течение 1 мин; отжиг при 60°C ( $\beta$ -actin) и при 62°C (36B4) в течение одной мин; элонгация при 72°C в течение одной минуты и окончательная элонгация при температуре 72°C в течение двух мин. Для установления концевых последовательностей генов  $\beta$ -actin и 36B4 проводили RACE-ПЦР с использованием набора Mint RACE (Евроген, Россия). В табл. 1 перечислены олигонуклеотиды, использованные в этом исследовании. Анализ продуктов реакции проводили в 1.2%-ном агарозном геле.

Полученные продукты дополнительно очищали с помощью набора Cleanup Mini (Евроген, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенные продукты клонировали в вектор для клонирования pAL2-T (Евроген, Россия) и секвенировали с использованием набора для

секвенирования Big Dye Terminator Cycle (Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколом производителя. Нуклеотидные последовательности *S. heterospiculatum* 36B4 и  $\beta$ -actin доступны в базе данных GenBank NCBI под регистрационными номерами PP830849.1 и PP830850.1.

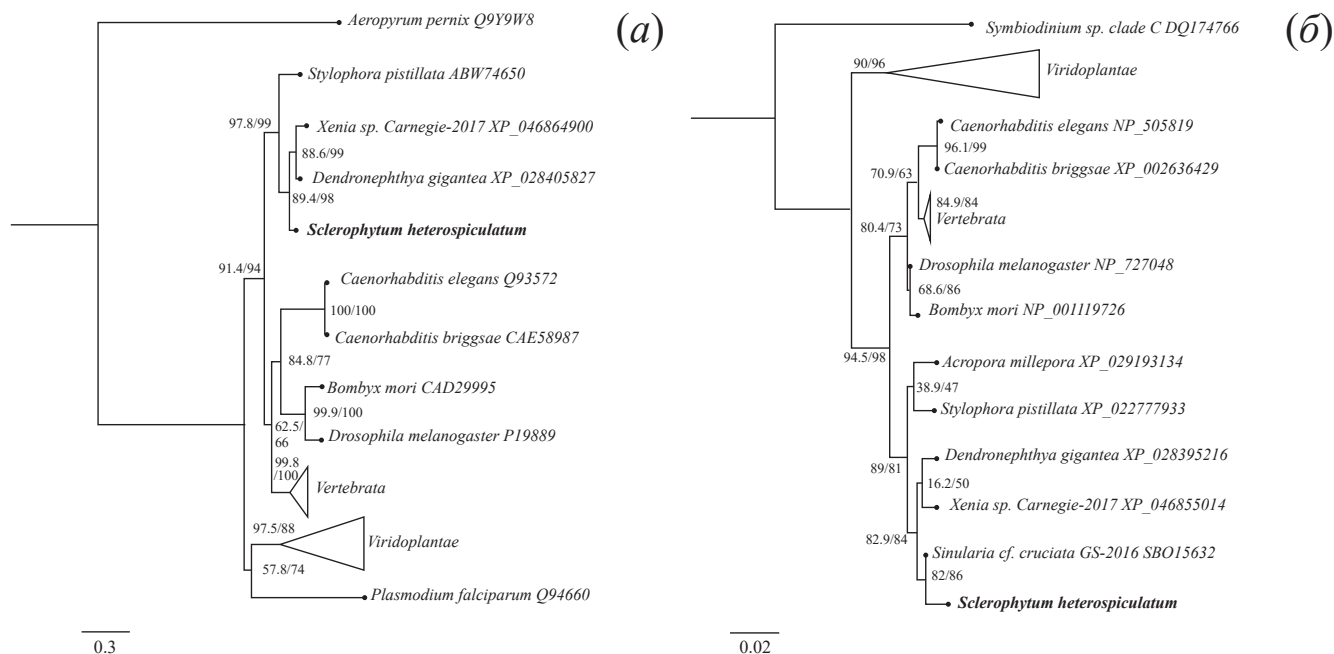
Анализ полученных последовательностей проводили с помощью ресурса NCBI blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Перевод нуклеотидных последовательностей в аминокислотные проводили с помощью ресурсов NCBI blastx и MEGA11 (<https://www.megasoftware.net/home>). Филогенетический анализ проводили с помощью веб-версии программы IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) [9]. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей выполнили в программе COBALT NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>). Для удаления низкоконсервативных последовательностей использовали программу Noisy v.1.5.12.1 (<https://ngphylogeny.fr/tools/tool/269/form>). Филогенетическое дерево построили с использованием метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML), оценку достоверности кластеризации проводили методом ultrafast bootstrap с 1000 повторами [10]. Филогенетические деревья построили с использованием моделей LG+G4 ( $\beta$ -actin) и LG+F+G4 (36B4) [11]. Визуализировали филогенетические деревья в программе FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

На первом этапе ПЦР с вырожденными олигонуклеотидами были получены фрагменты 344 пн и 300 пн. Анализ данных последовательностей в NCBI blastx показал, что фрагмент 344 пн соответствовал кислоте рибосомальному фосфопротеину P0 (также упоминается в литературе как 36B4, или RPLP0), а 300 пн –  $\beta$ -актину. После проведения RACE-ПЦР 5'-конца нуклеотидная

**Таблица 1.** Последовательности вырожденных и ген-специфических олигонуклеотидов, использованных в этом исследовании

Ген	Прямой олигонуклеотид (5'–3')	Обратный олигонуклеотид (5'–3')
Вырожденные олигонуклеотиды для ПЦР, нацеленные на консервативные участки в генах $\beta$ -actin и 36B4		
$\beta$ -actin	ACCACAACCGCAGAAAGNGA – “F1”	ACATAGTAGAGCCGCCAGAC – “R1”
36B4	GCHTCTGAATCCACGCTKYT – “F1”	AGTCAAACAGTCCGAATCCCA – “R1”
Ген-специфические олигонуклеотиды для 3' и 5' RACE ПЦР		
$\beta$ -actin RACE	AGGGGTACTCGTTCACCAC* CTTGGTATGGAGTCTGCTGGTATC*	AATCACTGCTCTCGCTCCAC** TATCCACGAGACCTGCTACAAC**
36B4 RACE	TCCGTGTCATTGGCGATTGC* ATCCAACGTGCGCCTCTGTG* TGCTTGCCGTTGCCTTGGAAG*	CTGAGAAAGAGGAAGAAAGAAAGAAAG** TTTCCAGCAGTTGAGCAG** GTGACAGCGGTGAAGCGGAAG**

Примечание. \* – 5', \*\* – 3'.



**Рис. 1.** Филогенетические деревья, построенные на основе метода максимального правдоподобия (ML) для аминокислотных последовательностей генов. *a* – *36B4*, *б* –  $\beta$ -actin различных организмов; цифры в узлах означают SH-aLRT-поддержку (%) / поддержку сверхбыстрой начальной загрузки (%).

последовательность гена *36B4* составила 416 пн,  $\beta$ -actin – 918 пн. Установить нуклеотидную последовательность 3'-конца кДНК для обоих генов в ходе данного исследования не удалось. Выведенная аминокислотная последовательность *36B4* содержала консервативный С-концевой домен, который участвует во взаимодействии с факторами элонгации во время трансляции [12]. Этот домен является одним из трех основных доменов RPLP0, необходимых для нормального функционирования белка [12]. Выведенная аминокислотная последовательность  $\beta$ -actin в своей структуре содержала два основных домена: большой домен и малый домен [13].

Основной проблемой в исследовании кораллов молекулярно-генетическими методами является выделение свободной от симбиотических динофлагеллят коралловой РНК. Филогенетические деревья, построенные с использованием метода максимального правдоподобия для последовательностей *36B4* и  $\beta$ -actin, подтвердили что *36B4* и  $\beta$ -actin, клонированные в этом исследовании, идентифицированы как коралловые *36B4* и  $\beta$ -actin, так как последовательности не группировались с последовательностями клада Alveolata (*Plasmodium falciparum* (Q94660); *Symbiodinium sp. clade C* (DQ174766)), но были близки к кораллам *Stylophora pistillata* (ABW74650; XP\_022777933), *Xenia sp. Carnegie-2017* (XP\_046864900; XP\_046855014), *Dendronephthya gigantea* (XP\_028405827; XP\_028395216) и *Sinularia cf. cruciata* GS-2016 (SBO15632). Таким образом,

гены *36B4* и  $\beta$ -actin необходимы для нормального функционирования клеток [14], отличаются высокой консервативностью между таксонами, что объясняется филогенетическим деревом, полученным в этой работе. В ходе настоящего исследования не удалось установить полноразмерные последовательности данных генов. Несмотря на это, установленных фрагментов последовательностей достаточно для того, чтобы подобрать олигонуклеотиды для ПЦР в реальном времени.

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Исследование одобрено Этическим комитетом Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (№ 16150-208-01/122 от 31 января 2023 г.).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Daly M., Brugler M.R., Cartwright P. et al. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus\* // Zootaxa. 2007.

- V. 1668. P. 127–182.  
<https://doi.org/10.5281/zenodo.180149>
2. Tursch B., Tursch A. The soft coral community on a sheltered reef quadrat at Laing Island (Papua New Guinea) // *Mar. Biol.* 1982. V. 68. P. 321–332. <https://doi.org/10.1007/bf00409597>
  3. Fabricius K.E. Soft coral abundance on the central Great Barrier Reef: Effects of *Acanthaster planci*, space availability, and aspects of the physical environment // *Coral Reefs.* 1997. V. 16. P. 159–167.  
<https://doi.org/10.1007/s003380050070>
  4. Boilard A., Dube C.E., Gruet C. et al. Defining coral bleaching as a microbial dysbiosis within the coral holobiont // *Microorganisms.* 2020. V. 8.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8111682>
  5. Sikorskaya T.V., Ermolenko E.V. Changes of phospholipid molecular species profile upon bleaching and subsequent restoration of coral sinularia heterospiculata // *Chem. Nat. Compd.* 2024. V. 60. P. 215–219.  
<https://doi.org/10.1007/s10600-024-04291-w>
  6. Dean J.M., Lodhi I.J. Structural and functional roles of ether lipids // *Protein Cell.* 2018. V. 9. P. 196–206.  
<https://doi.org/10.1007/s13238-017-0423-5>
  7. Karge W.H., Schaefer E.J., Ordovas J.M. Quantification of mRNA by polymerase chain reaction (PCR) using an internal standard and a nonradioactive detection method // *Methods Mol. Biol.* 1998. V. 110. P. 43–61.  
<https://doi.org/10.1385/1-59259-582-0:43>
  8. Kozera B., Rapacz M. Reference genes in real-time PCR // *J. Appl. Genet.* 2013. V. 54. P. 391–406.  
<https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
  9. Nguyen L.-T., Schmidt H.A., von Haeseler A. et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 2015. V. 32. P. 268–274.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
  10. Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A. et al. Ufboot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. P. 518–522.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
  11. Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F. et al. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. P. 587–589.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
  12. Gagou M., Ballesta J.P., Kouyanou S. Cloning and characterization of the ribosomal protein CcP0 of the medfly *Ceratitis capitata* // *Insect. Mol. Biol.* 2000. V. 9. P. 47–55.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00156.x>
  13. Kabsch W., Vandekerckhove J. Structure and function of actin // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1992. V. 21. P. 49–76.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.bb.21.060192.000405>
  14. Ishii K., Washio T., Uechi T. et al. Characteristics and clustering of human ribosomal protein genes // *BMC Genomics.* 2006. V. 7. P. 37.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-37>

## The $\beta$ -actin and 36B4 Genes in the Soft Coral *Sclerophytum heterospiculatum* (Verseveldt, 1970)

E. T. Bizikashvili<sup>1, \*</sup>, E. V. Shamshurina<sup>1</sup>, T. V. Sikorskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia*

*\*e-mail: bilielena801@gmail.com*

Coral polyps are the subject of various studies, including in the field of molecular biology. At the moment, much attention is being paid to molecular studies of corals of the Hexacorallia subclass. For this purpose, we identified and characterized the sequences of the  $\beta$ -actin and 36B4 genes from the soft coral *Sclerophytum heterospiculatum* (Verseveldt, 1970). The 36B4 and  $\beta$ -actin genes are necessary for the normal functioning of cells and are highly conservative between taxa, which are confirmed by the phylogenetic tree obtained in this work.

**Keywords:** Cnidaria, Octocorallia, actin, *RPLP0*, 36B4.