



УДК 576.8

DOI <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.26.3>

## Детекция и анализ структур CRISPR-Cas-систем в геноме плазмиды рУС-1 из штамма *Bacillus thuringiensis* УС-10

Н. А. Арефьева<sup>1</sup>, Ю. П. Джиоев<sup>2</sup>, А. Ю. Борисенко<sup>2</sup>,  
Л. А. Степаненко<sup>2</sup>, Н. П. Перетолчина<sup>2</sup>, Ю. С. Букин<sup>3,4</sup>,  
В. И. Чемерилова<sup>1</sup>, О. Ф. Вятчина<sup>1</sup>, О. А. Секерина<sup>2</sup>, Ю. А. Маркова<sup>5</sup>,  
Г. В. Юринова<sup>1</sup>, В. П. Саловарова<sup>1</sup>, А. А. Приставка<sup>1</sup>,  
В. А. Кузьминова<sup>1</sup>, А. С. Мартынова<sup>1</sup>, В. И. Злобин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Иркутский государственный университет, Иркутск

<sup>2</sup>Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск

<sup>3</sup>Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

<sup>4</sup>Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск

<sup>5</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

E-mail: arefieva.n4@gmail.com

**Аннотация.** Описан поиск и анализ структур CRISPR-Cas-системы в геноме плазмиды рУС-1, которая является мегаплазмидой штамма *Bacillus thuringiensis* УС-10. Биоинформационный поиск структур CRISPR-Cas-системы включал три этапа: идентификация cas-генов, детекция CRISPR-кассет и анализ их структур. Идентификацию cas-генов проводили через их аминокислотный профиль при помощи программы MacSyFinder. Детекцию и анализ CRISPR-кассет проводили при помощи приложений CRISPRFinder, CRISPRDetect, PILER-CR, CRISPR Recognition Tool (CRT). Консенсусная структура для множественного выравнивания межспейсерных повторов получена и визуализирована в WebLogo 3. Положение консенсусной последовательности в классификации CRISPR-ассоциированных повторов определено через web-сервис CRISPRmap (v. 1.3.0). Анализ структуры CRISPR-локуса проводили, используя программную платформу Artemis (v. 17.0.1). Тип CRISPR-Cas-системы определяли в соответствии с последней версией классификации. Описаны структуры CRISPR-Cas-системы, обнаруженные в результате программного поиска. Проведён анализ структуры выявленных CRISPR-кассет. Наличие в плазмидном геноме CRISPR-Cas-системы может свидетельствовать о возможной передаче данного локуса от бактериальной хромосомы плазмиде. Выдвинуто предположение, что данные системы могут передаваться путём конъюгации в бактериальных сообществах. Отмечена высокая эффективность применения описываемого биоинформационного алгоритма для детекции структур CRISPR-Cas-систем во внехромосомных элементах генома.

**Ключевые слова:** *Bacillus thuringiensis*, штамм УС-10, плазмиды, плаزمида рУС-1, CRISPR-Cas-система, методы биоинформатики.

**Для цитирования:** Детекция и анализ структур CRISPR-Cas-систем в геноме плазмиды рУС-1 из штамма *Bacillus thuringiensis* УС-10 / Н. А. Арефьева, Ю. П. Джиоев, А. Ю. Борисенко, Л. А. Степаненко, Н. П. Перетолчина, Ю. С. Букин, В. И. Чемерилова, О. Ф. Вятчина, О. А. Секерина, Ю. А. Маркова, Г. В. Юринова, В. П. Саловарова, А. А. Приставка, В. А. Кузьминова, А. С. Мартынова, В. И. Злобин // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2018. Т. 26. С. 3–17. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.26.3>

### **Введение**

Поиск и анализ в бактериальном геноме локусов CRISPR-Cas-систем является одним из новых направлений биоинформатики. CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated proteins – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами с CRISPR-ассоциированными белками) – адаптивные иммунные системы бактерий и архей, обеспечивающие защиту от чужеродных генетических элементов, таких как бактериофаги, транспозоны и плазмиды [Intervening sequences ... , 2005; CRISPR provides ... , 2007, CRISPR-based adaptive ... , 2009]. Эти системы были найдены примерно у 45 % бактерий и 90 % архей, представленных в базах данных CRISPRdb (<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/>) [Grissa, Vergnaud, Pourcel, 2007a, 2007b] и CRISPRI (<http://crispi.genouest.org/>) [CRISPI: a CRISPR ... , 2009] на август 2018 г. Всплеск интереса к ним связан с открытием молекулярных механизмов функционирования белка Cas9, являющегося эффекторной эндонуклеазой CRISPR-Cas-систем II типа. На сегодня технологии CRISPR-Cas9 эффективно применяются для направленного редактирования геномов живых систем [Doudna, Charpentier, 2014].

В организации CRISPR-Cas-систем принято выделять три структуры — CRISPR-кассеты, лидерную последовательность и кластер *cas*-генов. CRISPR-кассеты представляют собой набор коротких повторяющихся последовательностей размером 21–48 п. н. В промежутках между повторами находятся уникальные спейсерные сайты (26–72 п. н.), гомологичные участкам фагов и плазмид, к которым данная бактерия имеет «иммунитет» [Clustered regularly ... , 2005]. Перед CRISPR-кассетой расположена лидерная последовательность – консервативная АТ-богатая область длиной 100–500 п. н., которая содержит промотор и обеспечивает однонаправленную транскрипцию CRISPR-касеты [Bhaya, Davison, Barrangou, 2011].

*Cas*-гены организованы в два модуля, кодирующих субъединицы адаптационного и эффекторного комплексов, обеспечивающих функционирование CRISPR-локусов [Makarova, Wolf, Koonin ... , 2013; Koonin, Makarova, Zhang, 2017]. Механизм действия CRISPR-Cas систем обычно разделяют на три стадии: 1) приобретение новых спейсеров, или адаптация; 2) транскрипция CRISPR-касеты и процессинг пре-сгРНК (пре-CRISPR РНК) на короткие направляющие сгРНК-фрагменты; 3) интерференция, во время которой происходит специфическое распознавание и уничтожение чужеродных генетических элементов [CRISPR provides acquired ... , 2007; Gasiunas, Sinkunas, Siksnys, 2014; Hille, Charpentier, 2016].

Согласно последней классификации, основанной на особенностях организации локусов и архитектуры эффекторного комплекса, CRISPR-Cas системы разделяют на два класса, объединяющих пять типов и 16 подтипов. CRISPR-Cas-системы первого класса имеют мульти-субъединичный эффекторный комплекс. На основании сигнатурных генов *cas3* и *cas10*, кодирующих эндонуклеазы интерференции, здесь выделяют наиболее общие и разнообразные типы I и III. Сюда же входит наиболее редкий тип IV с сиг-

натурным геном *csfI*, включающим рудиментальные CRISPR-локусы, в которых отсутствуют гены адаптационного модуля (*cas1*, *cas2*). Во втором классе эффекторный комплекс представлен одним мультидоменным белком: Cas9 у типа II или Cpf1 у типа V [Koonin, Makarova, Zhang, 2017].

Исследования разнообразия структур и механизмов функционирования CRISPR-Cas систем лежат в основе разработки технологий направленного редактирования геномов прокариот и эукариот [Doudna, Charpentier, 2014; The revolution continues, 2017; Hsu, Lander, Zhang, 2014; Cong, Zhang, 2015]. Одним из перспективных направлений является исследование вариативности CRISPR-локусов в геномах бактерий, архей и мобильных генетических элементов в зависимости от их эколого-географического распространения. У авторов работы уже имеются результаты по исследованию разнообразия структур CRISPR-Cas-систем в геномах условно-патогенных и патогенных бактерий, выделенных из объектов окружающей среды и от пациентов с инфекционными заболеваниями [Биоинформационный анализ ... , 2016; Детекция структур ..., 2018; Использование биоинформационных ... , 2015; Характеристика CRISPR-Cas ... , 2018; Prospects to Enhance ... , 2018]

Расшифровка структуры спейсеров в CRISPR-касетах позволяет получить информацию об устойчивости к фагам промышленно важных бактериальных штаммов, среди которых особое место занимают штаммы вида *Bacillus thuringiensis*.

*B. thuringiensis* (Bt) – грамположительные аэробные спорообразующие бактерии из группы *Bacillus cereus*. Особый интерес этот вид представляет для сельского хозяйства и медицины в связи с его способностью продуцировать широкий спектр белковых токсинов. Кристаллические Cry и Cyt белки (дельта-эндотоксины) и Vip-токсины обуславливают энтомопатогенные свойства штаммов Bt. Созданные на их основе инсектицидные препараты применяются в борьбе с насекомыми из отрядов Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera [*Bacillus thuringiensis* ... , 2014]. Разновидностью Cry-токсинов, синтезируемых штаммами Bt, являются параспорины (PS), которые обладают токсическим воздействием на раковые клетки млекопитающих [Ohba, Mizuki, Uemori, 2009; Melo, Socol, Socol, 2016].

Целью настоящей работы стали поиск и анализ структур CRISPR-Cas-системы в геноме плазмиды pYC-1 из штамма *Bacillus thuringiensis* YC-10 с использованием программных средств биоинформатики.

### **Материалы и методы**

Материалом для исследования стал геном плазмиды pYC-1 из штамма *Bacillus thuringiensis* YC-10, который в 2010 г. был выделен из корней табака в провинции Хунань в Китае. Нуклеотидные последовательности бактериальной хромосомы (NZ\_CP011349.1) и девяти плазмид данного штамма (табл. 1) были загружены из базы данных RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>). В самой крупной плазмиде pYC-1 обнаружены шесть генов, кодирующих инсектицидные кристаллические белки (ICP): cry1Aa, cry1Ac, cry1Ia, cry2Aa, cry2Ab и cryB1 [Complete genome ... , 2015].

Таблица 1

Характеристики плазмид, выделенных из штамма *Bacillus thuringiensis* YC-10

Название	Номер в базе RefSeq	Размер последовательности, п. н.	Количество кодирующих регионов (CDS)
pYC-1	NZ_CP011350.1	761 374	701
pYC-3	NZ_CP011351.1	80 704	84
pYC-4	NZ_CP011352.1	46 634	67
pYC-5	NZ_CP011353.1	17 063	12
pYC-6	NZ_CP011354.1	8 511	10
pYC-10	NZ_CP011355.1	14 894	24
pYC-11	NZ_CP011356.1	7129	10
pYC-20	NZ_CP011357.1	90 519	114
pYC-2226	NZ_CP011358.1	82 300	87

Биоинформационный поиск и анализ структур CRISPR-Cas-системы включал три этапа: идентификацию *cas*-генов, детекцию CRISPR-кассет и анализ их структур. Идентификацию *cas*-генов проводили через их аминокислотный профиль при помощи программы MacSyFinder (Macromolecular System Finder, v. 1.0.5.), работающей на базе программных пакетов HMMER v. 3.1. и makeblastdb v. 2.7.1. [MacSyFinder: A Program ... , 2014]. Для получения характеристик нефункционирующих копий CRISPR-ассоциированных генов применяли алгоритм blastx (v. 2.7.1.) по локально собранной базе данных Cas-белков. Детекцию и анализ CRISPR-кассет проводили при помощи четырёх приложений: 1) CRISPRFinder (<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/>); 2) CRISPRDetect ([http://brownlabtools.otago.ac.nz/CRISPRDetect/predict\\_crispr\\_array.](http://brownlabtools.otago.ac.nz/CRISPRDetect/predict_crispr_array.)); 3) PILER-CR; 4) CRISPR Recognition Tool (CRT) [2007]. Консенсусная структура для множественного выравнивая межспейсерных повторов получена и визуализирована в WebLogo 3 (<http://weblogo.threeplusone.com>) [WebLogo: a sequence ... , 2004]. Положение консенсусной последовательности в классификации CRISPR-ассоциированных повторов было определено через web-сервис CRISPRmap v. 1.3.0. (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/CRISPRmap/Input.jsp>) [CRISPRmap: an automated, 2013]. Анализ структуры CRISPR-локуса проводили, используя программную платформу Artemis v. 17.0.1. [Artemis: an integrated ..., 2012]. Тип CRISPR-Cas-системы определяли в соответствии с последней версией классификации [Koonin, Makarova, Zhang, 2017].

### Результаты и обсуждение

В геноме плазмиды pYC-1 обнаружен один CRISPR-локус протяжённостью 9 404 п. н. (рис. 1). Были идентифицированы четыре CRISPR-ассоциированных гена эффекторного модуля: *cas3*, *cas5c/cas5d*, *cas8c/csd1* и четыре копии гена *cas7c/csd2*, три из которых не являются функционирующими. Генов адапционного модуля (*cas1*, *cas2*, *cas4*), необходимых для интеграции новых спейсеров в CRISPR-кассету, в плазмиде pYC-1 найдено не было (табл. 2). Согласно современной классификации, найденная CRISPR-Cas-система относится к первому классу, типу I, подтипу C (Dvulg

subtype). Данный подтип впервые был структурно-функционально охарактеризован у *B. halodurans* [Cas5d protein ... , 2015]. В других плаزمиде исследуемого штамма не было найдено CRISPR-структур и *cas*-генов. В бактериальной хромосоме обнаружены десять нефункционирующих копий гена *cas3*.

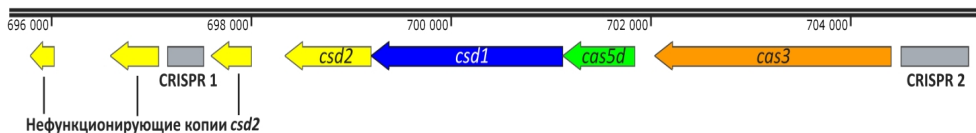


Рис. 1. Организация локуса CRISPR-Cas-системы в геноме плазмиды pYC-1 штамма *B. thuringiensis* YC-10. Схема выполнена с помощью программы SnapGene Viewer v. 4.2.1

Таблица 2

Характеристики *cas*-генов, выявленных в геноме плазмиды pYC-1 штамма *B. thuringiensis* YC-10

Гены	Позиции (начало–конец, н.о.)	№ белка в базе данных RefSeq	Размер белка (а. о.)	Score (bits)	E-value	Query cover	% совпавших аминокислот
<i>cas7c/csd2</i>	698 344–699 204	WP_000853368.1	286	360.1	2.9e-109	0.93	0.92
<i>cas8c/csd1</i>	699 207–701 126	WP_000118651.1	639	457.1	3e-138	1.00	0.97
<i>cas5c/cas5d</i>	701 127–701 846	WP_003319726.1	239	278.9	1.1e-84	0.99	0.84
<i>cas3</i>	702 052–704 421	WP_014481878.1	789	146.6	3.6e-44	0.93	0.43
Нефункциональные копии							
<i>cas7c/csd2</i>	695 787–696 034	WP_000853368.1	–	97.1	1.3e-25	0.18	0.93
<i>cas7c/csd2</i>	696 598–697 077	WP_088060687.1	–	307	1.1e-106	0.56	0.93
<i>cas7c/csd2</i>	697 604–698 011	WP_098665124.1	–	239	3.2e-80	0.48	0.86

Примечание: Score (bits) – вес парного выравнивания исследуемой аминокислотной последовательности с аминокислотными профилями CRISPR-ассоциированных белков; E-value – статистическая значимость выравнивания; Query cover – степень перекрытия аминокислотных профилей CRISPR-ассоциированных белков с исследуемой аминокислотной последовательностью.

При помощи четырёх поисковых алгоритмов в исследуемой плазмиде pYC-1 обнаружены две CRISPR-кассеты, локализованные по обе стороны от последовательности *cas*-генов в позициях 697 170–697 531 и 704 505–705 191 п. н. (см. рис.1).

Межспейсерные повторы в найденных CRISPR-кассетах имеют размер 32 п. н. (рис. 2). В первой кассете число спейсерных последовательностей составило 5, их размеры варьируют от 33 до 35 п. н. Вторая включает 10 спейсеров по 32–35 п. н. (табл. 3). Консенсусная последовательность межспейсерных повторов принадлежит к семейству 3, суперклассу D, ассоциированному с CRISPR-Cas-системами подтипа I-C.

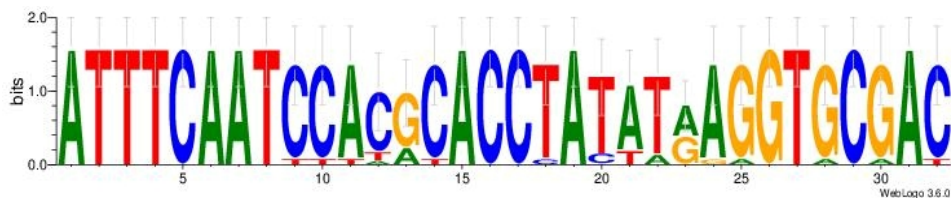


Рис. 2. Консенсусная последовательность межспейсерных повторов в геноме плазмиды рУС-1, полученная при помощи приложения WebLogo 3.6.0. Размер символа указывает степень варибельности нуклеотида

Таблица 3

Спейсерные последовательности в CRISPR-касетах в геноме плазмиды рУС-1 штамма *B. thuringiensis* УС-10

№	Начало	Последовательность	Конец	Размер
CRISPR 1				
1	697 202	TTGTTTTTCACAAAGCATTAATACCAGCTACAT	697 235	33
2	697 267	TTCTTTTGATCCGTAAGAACGTTCCATTTCCAT	697 300	33
3	697 332	GTCCCTCCATCGGCGGCAGCTCATATTCAATTAT	697 367	35
4	697 399	TCGATTCCACTTGTTTCAGGCTCTTGAATATCAT	697 433	34
5	697 465	ATCCATTTGTTGTTACTTATGAACTACCGCCAATG	697 600	35
CRISPR 2				
1	704 536	CATGACTGAATTTTGTCAAAATTGTGATATTAT	704 569	33
2	704 601	TATGAGCGTTCAGATAAATATAAACCCGAGGTA	704 635	34
3	704 667	TGAAAACGGAAAAACAATTGAGCTAGTTGCAAA	704 700	33
4	704 732	TATGGGCATTCAGATAAATATAAACCCGAGGTA	704 766	34
5	704 798	TGGTCTAACATCTAAAGCCATTAATAACTCCTA	704 831	33
6	704 863	TGCAAAGACGATCATAACGACTGGAGCAACAAA	704 896	33
7	704 928	ATACACTTTTTTTGATTTCTTCTACTATCTTC	704 960	32
8	704 992	TTTAAAACGTGCATAACCTAACACTTTCCCATTTGT	705 027	35
9	705 059	TTTTTACTCGGATACTCTAAAGGTGTAACAATA	705 093	34
10	705 125	ATGTGGGTGACGTCATTAATTCTCGTATCTTGT	705 159	34

Ранее CRISPR-Cas-система подтипа I-C была обнаружена в плазмиде pFR260 (KX258624.1) из штамма *B. thuringiensis* INTA Fr7-4 [Complete Sequence ... , 2017]. По данным авторов, в плазмиде pFR260 найдены 3 CRISPR-касеты и 9 *cas*-генов, в том числе гены адаптационного модуля (*cas1*, *cas2*, *cas4*). Гомологичная последовательность *cas*-генов была найдена ещё в двух плаزمидях: pBT1850294 (NZ\_CP014284.1) из *B. thuringiensis* Bt185 и pBTHD521-5 (NZ\_CP010111.1) из *B. thuringiensis* serovar indiana HD521 [Complete Sequence ... , 2017]. Однако их CRISPR-локусы не были описаны. В настоящее время в базах научных публикаций отсутствуют работы по анализу структур CRISPR-Cas-систем в плазмидях штаммов *B. thuringiensis*.

### Заключение

Современные методы биоинформатики предоставляют огромные возможности для проведения модельных исследований по изучению структуры, функционирования и эволюции CRISPR-Cas систем. В настоящей работе с помощью этого подхода в геноме мегаплазмиды pYS-1 штамма *Bacillus thuringiensis* YC-10 был идентифицирован один локус CRISPR-Cas-системы подтипа I-C, включающей две CRISPR-кассеты и расположенную между ними последовательность *cas*-генов. Идентифицированный набор CRISPR-ассоциированных генов обеспечивает процессинг пре-crPHK и специфическое распознавание протоспейсеров фагов и плазмид через спейсерные последовательности. Однако в связи с отсутствием генов адаптационного модуля приобретение новых спейсеров не происходит. Наличие в плазмидном геноме CRISPR-Cas-системы может свидетельствовать о её возможной передаче от бактериальной хромосомы плазмиде. Также не исключено, что эта система может передаваться путём конъюгации как между штаммами *B. thuringiensis*, так и внутри рода *Bacillus*. Полученная информация о спейсерном составе CRISPR-кассет позволяет провести идентификацию протоспейсеров бактериофагов и чужеродных плазмид, к которым штамм *B. thuringiensis* YC-10 может обладать устойчивостью. Согласно полученным нами результатам, отработанный программный алгоритм позволяет эффективно проводить поиск и анализ структур CRISPR-Cas-систем в хромосомном геноме и в геноме плазмид и бактериофагов, связанных со штаммами вида *B. thuringiensis*.

### Список литературы

Биоинформационный анализ CRISPR-Cas системы штамма *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953 / Н. П. Переголчина, Ю. П. Джиоев, А. Ю. Борисенко, Е. А. Воскресенская, А. И. Парамонов, Л. А. Степаненко, О. В. Колбасеева, В. И. Злобин // Acta Biomedica Scientifica. 2016. № 5. С. 64–68.

Детекция структур CRISPR-Cas систем в геноме штамма *Pseudomonas aeruginosa* UCSPP-PA14 методами биоинформатики / О. В. Колбасеева, Ю. П. Джиоев, А. Ю. Борисенко, Л. А. Степаненко, В. И. Злобин, В. И. Колбасеева // Журнал инфектологии. 2018. Т. 10, № 2. С. 62–63.

Использование биоинформационных программных методов для поиска CRISPR-Cas систем в геномах штаммов *Staphylococcus aureus* / А. Ю. Борисенко, Ю. П. Джиоев, А. И. Парамонов, Ю. С. Букин, Л. А. Степаненко, О. В. Колбасеева, И. В. Злобин. // Сибирский медицинский журнал. 2015. № 2. С. 71–74.

Характеристика CRISPR-Cas систем в геноме *Neisseria meningitidis* FDAARGOS\_214 30-31 / Л. А. Степаненко, Ю. П. Джиоев, А. Ю. Борисенко, В. И. Злобин, О. В. Колбасеева, И. В. Малов // Журн. инфектологии, 2018. Т. 10. № 1. С. 30–31.

An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems / K. S. Makarova, Y. I. Wolf, O. S. Alkhnbashi, F. Costa, S. A. Shah, S. J. Saunders, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, D. H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, R. M. Terns, M. P. Terns., M. F. White, A. F. Yakunin, R. A. Garrett, J. van der Oost, R. Backofen, E. V. Koonin // Nat. Rev. Microbiol. 2015. Vol. 13, N 11. P. 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>

Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data / T. Carver, S. R. Harris, M. Berriman, J. Parkhill, J. A. McQuillan. Bioinformatics. 2012. Vol. 5, N 4. P. 464–469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>

*Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. L. Palma, D. Munoz, C. Berry, J. Murillo, P. Caballero // *Toxins* (Basel). 2014. Vol. 6, N 12. P. 3296–3325. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>

Bhaya D., Davison M., Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation // *Annu. Rev. Genet.* 2011. N 45. P. 273–297. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>

Cas5d protein processes pre-crRNA and assembles into a cascade-like interference complex in subtype I-C/Dvulg CRISPR-Cas system / K. H. Nam, C. Haitjema, X. Liu, F. Ding, H. Wang, M. P. DeLisa, A. Ke // *Structure*. 2012. Vol. 20, N 9. P. 1574–1584. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.06.016>

Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin / A. Bolotin, B. Quinquis, A. Sorokin, S. D. Ehrlich // *Microbiology*. 2005. Vol. 151. P. 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>

Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* YC-10, a novel active strain against plant-parasitic nematodes / F. Cheng, J. Wang, Z. Song, J. Cheng, D. Zhang, Y. Liu. // *J. Biotechnol.* 2015. Vol. 210, P. 17–18. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.395>

Complete Sequence and Organization of pFR260, the *Bacillus thuringiensis* INTA Fr7-4 Plasmid Harboring Insecticidal Genes / L. E. Navas, A. F. Amadio, E. M. Ortiz, D. H. Sauka, G. B. Benintende, M. F. Berretta, R. O. Zandomeni // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2017. Vol. 27, N 1. P. 43–54. <https://doi.org/10.1159/000451056>

Cong L. Zhang F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system // *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1239, P. 197–217. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1862-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1862-1_10)

CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes / R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D.A. Romero, P. Horvath // *Science*. 2007. Vol. 315, N 5819. P. 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>

CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats / C. Bland, T. L. Ramsey, F. Sabree, M. Lowe, K. Brown, N. C. Kyrpides, P. Hugenholtz // *BMC Bioinformatics*. 2007. Vol. 8, N 209. P. 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-209>

CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes / J. Van der Oost, M. M. Jore, E. R. Westra, M. Lundgren, S. J. Brouns // *Trends Biochem. Sci.* 2009. Vol. 34, N 8. P. 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.05.002>

CRISPI: a CRISPR interactive database / C. Rousseau, M. Gonnet, M. Le Romancer, J. Nicolas // *Bioinformatics*. 2009. Vol. 25, N 24. P. 3317–3318. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp586>

CRISPRDetect: A flexible algorithm to define CRISPR arrays / A. Biswas, R. H. Staals, S. E. Morales, P. C. Fineran, C. M. Brown // *BMC Genomics*. 2016. Vol. 17, N 356. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2627-0>

CRISPRmap: an automated classification of repeat conservation in prokaryotic adaptive immune systems / S. J. Lange, O. S. Alkhnbashi, D. Rose, S. Will, R. Backofen // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41, N 17. P. 8034–8044. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt606>

Doudna J. A., Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 // *Science*. 2014. Vol. 346, N 6213. P. 1258096–1258099. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>

Edgar R. C. PILER-CR: Fast and accurate identification of CRISPR repeats // *BMC Bioinformatics*. 2007. Vol. 8, N 18. P. 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-18>

Gasiunas G., Sinkunas T., Siksnys V. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014. Vol. 71, N 3. P. 449–465. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1438-6>

Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats // *Nucleic Acids Research*. 2007a. Vol. 35. P. W52–W57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm360>

Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats // *BMC Bioinformatics*. 2007b. Vol. 23, N 8. P. 172. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-172>



Hille F., Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2016. Vol. 371, N 1707. 12 p. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0496>

Hsu P. D., Lander E. S., Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering // *Cell*. 2014. Vol. 157, N 6. P. 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>

Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements / F. J. M. Mojica, C. Diez-Villasenor, J. Garcia-Martinez, E. Soria // *J. Mol. Evol.* 2005. Vol. 60. P. 174–182.

Koonin E. V., Makarova K. S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems // *Curr. Opin. Microbiol.* 2017. Vol. 37, P. 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>

MacSyFinder: A Program to Mine Genomes for Molecular Systems with an Application to CRISPR-Cas Systems / S. S. Abby, B. Neron, H. Menager, M. Touchon, E. P. C. Rocha // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, N 10, P. e110726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110726>

Makarova K. S., Wolf Y. I., Koonin E. V. The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems // *Biochem. Soc. Trans.* 2013. Vol. 41, N 6. P. 1392–400. <https://doi.org/10.1042/BST20130038>

Melo A. L., Soccol V. T., Soccol C. R. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2016. Vol. 36, N 2. P. 317–26. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793>

Ohba M., Mizuki E., Uemori A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis* // *Anticancer Res.* 2009. Vol. 29, N 1. P. 427–433.

Prospects to Enhance Phage Therapy by Looking At CRISP Fingerprints in Bacterial Populations / V. I. Zlobin, Y. P. Dzhioev, N. P. Peretolchina, A. Y. Borisenko, L. A. Stepanenko, Y. Wang, Z. Qu, R. Piemeef, O. N. Reva // *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*. 2018. Vol. 10, N 5. P. 1–3.

The Revolution Continues: Newly Discovered Systems Expand the CRISPR-Cas Toolkit / K. Murugan, K. Babu, R. Sundaresan, R. Rajan, D. G. Sashital // *Mol. Cell*. 2017. Vol. 68, N 1. P. 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.007>

WebLogo: a sequence logo generator / G. E. Crooks, G. Hon, J. M. Chandonia, S. E. Brenner // *Genome Res.* 2004. Vol. 14, N 6. P. 1188–1190.

## Detection and Analysis of CRISPR-Cas System Structures in Genome of Plasmid pYC-1 of *Bacillus thuringiensis* Strain YC-10

N. A. Arefieva<sup>1</sup>, Yu. P. Dzhioev<sup>2</sup>, A. Yu. Borisenko<sup>2</sup>, L. A. Stepanenko<sup>2</sup>, N. P. Peretolchina<sup>2</sup>, Yu. S. Bukin<sup>3,4</sup>, V. I. Chemerilova<sup>1</sup>, O. F. Vyatchina<sup>1</sup>, O. A. Sekerina<sup>2</sup>, Yu. A. Markova<sup>5</sup>, G. V. Yurina<sup>1</sup>, V. P. Salovarova<sup>1</sup>, A. A. Pristavka<sup>1</sup>, V. A. Kuzminova<sup>1</sup>, A. S. Martynova<sup>1</sup>, V. I. Zlobin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Irkutsk State University, Irkutsk

<sup>2</sup>Irkutsk State Medical University, Irkutsk

<sup>3</sup>Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

<sup>4</sup>Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk

<sup>5</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

**Abstract.** The aim of this work was to search and analyze the structures of the CRISPR-Cas system in the genome of the plasmid pYC-1 from the strain *Bacillus thuringiensis* YC-10 using a selected algorithm of bioinformatics software. A search and analysis of the structures of the CRISPR-Cas-system in the genome of the plasmid pYC-1, which is a megaplasmid of the

strain *B. thuringiensis* YC-10, was carried out. The bioinformatical search for CRISPR-Cas-system structures included three stages: identification of cas-genes, detection of CRISPR-cassettes and analysis of their structures. Identification of cas-genes was carried out through their amino acid profile using the MacSyFinder program. The detection and analysis of CRISPR cassettes was performed using four applications: 1) CRISPRFinder; 2) CRISPRDetect; 3) PILER-CR; 4) CRISPR Recognition Tool (CRT). A consensus structure for multiple alignment of inter-spacer repeats was obtained and visualized in WebLogo 3. The position of the consensus sequence in the classification of CRISPR-associated repeats was determined through the CRISPRmap web service (v1.3.0). The analysis of the structure of the CRISPR locus was performed using the software platform Artemis (ver. 17.0.1). The type of CRISPR-Cas system was determined in accordance with the latest version of the classification [Koonin et.al. 2017]. As a result of a software search in megaplasmid pYC-1, one CRISPR locus was found, classified as Class I, type I, subtype C. Two CRISPR cassettes and four CRISPR-associated genes were identified. The analysis of the structure of CRISPR-cassettes. The decoded spacer sequences provide information about bacteriophages and foreign plasmids to which this bacterial strain may be resistant. The presence of a CRISPR-Cas system in the plasmid genome may indicate a possible transfer of a given locus from the bacterial chromosome to the plasmid. It can also be assumed that these systems can be transmitted by conjugation in bacterial communities. The bioinformatics algorithm used in this work showed a high efficiency of its use for the detection of CRISPR-Cas-system structures in extrachromosomal elements of the genome.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, strain YC-10, plasmids, plasmid pYC-1, CRISPR-Cas system, bioinformatic methods.

**For citation:** Arefieva N.A., Dzhioev Yu.P., Borisenko A.Yu., Stepanenko L.A., Peretolchina N.P., Bukin Yu.S., Chemerilova V.I., Vyatchina O.F., Sekerina O.A., Markova Yu.A., Yurina G.V., Salovarova V.P., Pristavka A.A., Kuzminova V.A., Martynova A.C., Zlobin V.I. Detection and Analysis of CRISPR-Cas System Structures in Genome of Plasmid pYC-1 of *Bacillus thuringiensis* Strain YC-10. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2018, vol. 26, pp. 3-17. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.26.3> (in Russian)

## References

Peretolchina N.P., Dzhioev Yu.P., Borisenko A.Yu., Voskresenskaya E.A., Paramonov A.I., Stepanenko L.A., Kolbaseeva O.V., Zlobin V.I. Bioinformatsionnyi analiz CRISPR-Cas sistemy shtamma *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953 [Bioinformational analysis of *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953 CRISPR/cas system]. *Acta Biomedica Scientifica*, 2016, no. 5, pp. 64-68. (in Russian).

Kolbaseeva O.V., Dzhioev Yu.P., Borisenko A.Yu., Stepanenko L.A., Zlobin V.I., Kolbaseeva V. I. Detektsiya struktur CRISPR-Cas sistem v genome shtamma *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 metodami bioinformatiki [Detection of CRISPR/Cas system structure in genome of *Pseudomonas aeruginosa* strain UCBPP-PA14 using bioinformatic methods]. *Zhurnal infektologii* [Journal of Infectology], 2018. vol. 10, no. 2, pp. 62-63. (in Russian).

Borisenko A.Yu., Dzhioev Yu.P., Paramonov A.I., Bukin Yu.S., Stepanenko L.A., Kolbaseeva O.V., Zlobin I.V. Ispol'zovanie bioinformatsionnykh programmnykh metodov dlya poiska CRISPR-Cas sistem v genomakh shtammov *Staphylococcus aureus* [Use of bioinformatic methods for search CRISPR/Cas systems in genomes of the strains of *Staphylococcus aureus*]. *Sibirskii meditsinskii zhurnal* [Siberian Medical Journal], 2015, no. 2, pp. 71-74. (in Russian).

Stepanenko L.A., Dzhioev Yu.P., Borisenko A.Yu., Zlobin V.I., Kolbaseeva O.V., Malov I.V. Kharakteristika CRISPR-Cas sistem v genome *Neisseria meningitidis* FDAARGOS\_214 30-31 [Characteristic of CRISPR/Cas systems in genome of *Neisseria meningitidis* FDAARGOS\_214 30-31]. *Zhurnal infektologii* [Journal of Infectology], 2018, vol. 10, no. 1, pp. 30-31. (in Russian).

Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J., Charpentier E., Haft D. H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E.V. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, vol. 13, no. 11, pp. 722-736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>

Carver T., Harris S.R., Berriman M., Parkhill J., McQuillan J.A. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*, 2012, vol. 5, no. 4, pp. 464-469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>

Palma L., Munoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P. Bacillus thuringiensis toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 2014, vol. 6, no. 12, pp. 3296-3325. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>

Bhaya D., Davison M., Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu. Rev. Genet.*, 2011, no. 45, pp. 273-297. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>

Nam K.H., Haitjema C., Liu X., Ding F., Wang H., DeLisa M.P., Ke A. Cas5d protein processes pre-crRNA and assembles into a cascade-like interference complex in subtype I-C/Dvulg CRISPR-Cas system. *Structure*, 2012, vol. 20, no. 9, pp. 1574-1584. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.06.016>

Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, vol. 151, pp. 2551-2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>

Cheng F., Wang J., Song Z., Cheng J., Zhang D., Liu Y. Complete genome sequence of Bacillus thuringiensis YC-10, a novel active strain against plant-parasitic nematodes. *J. Biotechnol.*, 2015, vol. 210, pp. 17-18. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.395>

Navas L.E., Amadio A.F., Ortiz E.M., Sauka D.H., Benintende G.B., Berretta M.F., Zandomeni R.O. Complete Sequence and Organization of pFR260, the Bacillus thuringiensis INTA Fr7-4 Plasmid Harboring Insecticidal Genes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, vol. 27, no. 1, pp. 43-54. <https://doi.org/10.1159/000451056>

Cong L., Zhang F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods Mol. Biol.*, 2015, vol. 1239, pp. 197-217. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1862-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1862-1_10)

Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, vol. 315, no. 5819, pp. 1709-1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>

Bland C., Ramsey T.L., Sabree F., Lowe M., Brown K., Kyrpidis N.C., Hugenholtz P. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. *BMC Bioinformatics*, 2007, vol. 8, no. 209, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-209>

van der Oost J., Jore M.M., Westra E.R., Lundgren M., Brouns S.J. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem. Sci.*, 2009, vol. 34, no. 8, pp. 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.05.002>

Rousseau C., Gonnet M., Le Romancer M., Nicolas J. CRISPI: a CRISPR interactive database. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 24, pp. 3317-3318. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp586>

Biswas A., Staals R.H., Morales S.E., Fineran P.C., Brown C.M. CRISPRDetect: A flexible algorithm to define CRISPR arrays. *BMC Genomics*, 2016, vol. 17, no. 356. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2627-0>

Lange S.J., Alkhnbashi O.S., Rose D., Will S., Backofen R. CRISPRmap: an automated classification of repeat conservation in prokaryotic adaptive immune systems. *Nucleic Acids Res.*, 2013, vol. 41, no. 17, pp. 8034-8044. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt606>

Doudna J.A., Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, vol. 346, no. 6213, pp. 1258096-1258099. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>

- Edgar R.C. PILER-CR: Fast and accurate identification of CRISPR repeats. *BMC Bioinformatics*, 2007, vol. 8, no. 18, pp. 1-6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-18>
- Gasiunas G., Sinkunas T., Siksnys V. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2014, vol. 71, no. 3, pp. 449-465. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1438-6>
- Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. CRISPRfinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res.*, 2007, vol. 35, pp. W52-W57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm360>
- Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 2007, vol. 23, no. 8, pp. 172. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-172>
- Hille F., Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2016, vol. 371, no. 1707, pp. 20150496. DOI: 10.1098/rstb.2015.0496
- Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.*, 2014, vol. 157, no. 6, pp. 1262-1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Mojica F.J. M., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.*, 2005, vol. 60, pp. 174-182.
- Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2017, vol. 37, pp. 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>
- Abby S. S., Neron B., Menager H., Touchon M., Rocha E. P. C. MacSyFinder: A Program to Mine Genomes for Molecular Systems with an Application to CRISPR-Cas Systems. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 10, e110726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110726>
- Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V. The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems. *Biochem. Soc. Trans.*, 2013, vol. 41, no. 6, pp. 1392-400. <https://doi.org/10.1042/BST20130038>
- Melo A.L., Soccol V.T., Soccol C.R. Bacillus thuringiensis: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2016, vol. 36, no. 2, pp. 317-26. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793>
- Ohba M., Mizuki E., Uemori A. Parasporin, a new anticancer protein group from Bacillus thuringiensis. *Anticancer Res.*, 2009, vol. 29, no. 1, pp. 427-433.
- Zlobin V.I., Dzhioev Y.P., Peretolchina N.P., Borisenko A.Y., Stepanenko L.A., Wang Y., Qu Z., Pierneef R., Reva O.N. Prospects to Enhance Phage Therapy by Looking at CRISP Fingerprints in Bacterial Populations. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*, 2018, vol. 10, no. 5, pp. 1-3.
- Murugan K., Babu K., Sundaresan R., Rajan R., Sashital D.G. The Revolution Continues: Newly Discovered Systems Expand the CRISPR-Cas Toolkit. *Mol. Cell.*, 2017, vol. 68, no. 1, pp. 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.007>
- Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.M., Brenner S.E. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.*, 2004, vol. 14, no. 6, pp. 1188-1190.

Арефьева Надежда Александровна  
студент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952)42-27-17  
e-mail: arefieva.n4@gmail.com

Arefieva Nadezhda Aleksandrovna  
Student  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation,  
tel.: (3952)42-27-17  
e-mail: arefieva.n4@gmail.com

*Джиоев Юрий Павлович*  
кандидат биологических наук,  
ведущий научный сотрудник,  
заведующий лабораторией,  
НИИ биомедицинских технологий  
Иркутский государственный медицинский  
университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
тел.: (3952) 24–29–86  
e-mail: alanir07@mail.ru

*Борисенко Андрей Юрьевич*  
аспирант  
Иркутский государственный медицинский  
университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
тел.: (3952) 24–29–86  
e-mail: 89500720225@mail.ru

*Степаненко Лилия Александровна*  
кандидат медицинских наук,  
старший научный сотрудник  
НИИ биомедицинских технологий  
Иркутский государственный медицинский  
университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
тел.: (3952) 24–29–86  
e-mail: steplia@mail.ru

*Перетолчина Надежда Павловна*  
аспирант  
Иркутский государственный медицинский  
университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
тел.: (3952) 24–29–86  
e-mail: nadine1lenz@gmail.com

*Букин Юрий Сергеевич*  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Лимнологический институт СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Улан-Баторская, 3  
Иркутский национальный исследовательский  
технический университет  
Россия, 664074, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 83

*Dzhioev Yuri Pavlovich*  
Candidate of Sciences (Biology), Senior  
Research Scientist, Head of Laboratory  
Research Institute of Biomedical Technologies  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstaniya st., Irkutsk, Russian  
Federation, 664003  
tel.: (3952) 24–29–86  
e-mail: alanir07@mail.ru

*Borisenko Andrei Yurievich*  
Graduate Student  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk,  
664003, Russian Federation,  
tel.: (3952) 24–29–86  
e-mail: 89500720225@mail.ru

*Stepanenko Lilia Alexandrovna*  
Candidate of Sciences (Medicine), Senior  
Research Scientist, Research Institute  
of Biomedical Technologies  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
tel.: (3952) 24–29–86  
e-mail: steplia@mail.ru

*Peretolchina Nadezhda Pavlovna*  
Graduate Student  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk,  
664003, Russian Federation  
tel.: (3952) 24–29–86  
e-mail: nadine1lenz@gmail.com

*Bukin Yuri Sergeevich*  
Candidate of Sciences (Biology),  
Senior Research Scientist  
Limnological Institute SB RAS  
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk,  
664003, Russian Federation  
Irkutsk National Research Technical  
University  
83, Lermontov st., Irkutsk,  
664074, Russian Federation  
tel.: (3952) 42–65–04

тел.: (3952) 42–65–04  
e-mail: bukinys@lin.irk.ru

e-mail: bukinys@lin.irk.ru

*Чемерилова Валентина Ивановна*  
кандидат биологических наук, доцент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952)42–27–17  
e-mail: valchem@yandex.ru

*Chemerilova Valentina Ivanovna*  
Candidate of Sciences (Biology),  
Associate Professor  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
tel.: (3952)42–27–17  
e-mail: valchem@yandex.ru

*Вятчина Ольга Федоровна*  
кандидат биологических наук, доцент  
Иркутский государственный университет  
Россия 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952)42–27–17  
e-mail: olgairk3@rambler.ru

*Vyatchina Olga Fedorovna*  
Candidate of Sciences (Biology),  
Associate Professor  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation,  
tel.: (3952)42–27–17  
e-mail: olgairk3@rambler.ru

*Секерина Ольга Александровна*  
кандидат биологических наук, доцент  
Иркутский государственный медицинский  
университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. Красного  
Восстания, 1  
тел.: (3952) 24–38–43  
e-mail: o.sekerina@ismu.baikal.ru

*Sekerina Olga Aleksandrovna*  
Candidate of Biological Sciences,  
Associate Professor  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk,  
Russian Federation, 664003  
tel.: (3952) 24–38–43  
e-mail: o.sekerina@ismu.baikal.ru

*Маркова Юлия Александровна*  
доктор биологических наук, старший  
научный сотрудник, заведующая  
лабораторией  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
тел.: (3952) 42–67–21  
e-mail: juliam06@mail.ru

*Markova Julia Aleksandrovna*  
Doctor of Sciences (Biology), Senior  
Research Scientist, Head of Laboratory  
Siberian Institute of Plant Physiology and  
Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
tel.: (3952) 42–67–21  
e-mail: juliam06@mail.ru

*Юринова Галина Валерьевна*  
кандидат биологических наук, доцент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952)42–27–17  
e-mail: yurinova@yandex.ru

*Yurinova Galina Valerievna*  
Candidate of Sciences (Biology),  
Associate Professor  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation,  
tel.: (3952)42–27–17  
e-mail: yurinova@yandex.ru

*Саловарова Валентина Петровна*  
доктор биологических наук, профессор,

*Salovarova Valentina Petrovna*  
Doctor of Sciences (Biology), Professor,

заведующая кафедрой  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952)42–27–17  
e-mail: vsalovarova@rambler.ru

Head of Department  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation,  
tel.: (3952)42–27–17  
e-mail: vsalovarova@rambler.ru

Приставка Алексей Александрович  
кандидат биологических наук, доцент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952)42–27–17  
e-mail: pristavk@gmail.com

Pristavka Alexey Alexandrovich  
Candidate of Sciences (Biology),  
Associate Professor  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation,  
tel.: (3952)42–27–17  
e-mail: pristavk@gmail.com

Кузьмина Валерия Михайловна  
студент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952)42–27–17  
e-mail: ewwwrye@gmail.com

Kuzminova Valeria Mikhailovna  
Student  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation,  
tel.: (3952)42–27–17  
e-mail: ewwwrye@gmail.com

Мартынова Алена Сергеевна  
студент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952)42–27–17  
e-mail: martynovalen@mail.ru

Martynova Alena Sergeevna  
Student  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation,  
tel.: (3952)42–27–17  
e-mail: martynovalen@mail.ru

Злобин Владимир Игоревич  
доктор медицинских наук, профессор,  
академик РАН, заведующий кафедрой,  
директор, НИИ биомедицинских технологий  
Иркутский государственный медицинский  
университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
тел.: (3952) 24–29–86  
e-mail: vizlobin@mail.ru

Zlobin Vladimir Igorevich  
Doctor of Sciences (Medicine), Professor,  
Academician of RAS, Head of Department,  
Director, Research Institute of Biomedical  
Technologies  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk,  
Russian Federation, 664003  
tel.: (3952) 24–29–86  
e-mail: vizlobin@mail.ru