

Исследование РНК штаммов вируса диареи, подвергнутых воздействию низких температур

М.Ю. Стегний

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления вирусных геномов и определения нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК вирусов актуально как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях. Впервые ПЦР исследовала фирма Cetus в 1985 году. Проводимая в пробирке специфическая амплификация нуклеиновых кислот инициируется олигонуклеотидными праймерами (амплимерами). РНК также можно амплифицировать с помощью ПЦР, получив предварительно ее комплементарную ДНК-копию.

Ключевым звеном ПЦР является подбор праймеров, так как они определяют возможность амплификации и нужной последовательности. ПЦР-амплифицированные фрагменты ДНК чаще всего имеют размер 100-300 нуклеотидов, поскольку амплификация более длинных последовательностей-мишеней менее успешна. В случае полиморфизма, например у микроорганизмов, если нуклеотидная последовательность слегка отличается, может произойти ее неполное спаривание с амплимером, что ведет к получению ложно-отрицательного результата [2]. Предсказать полиморфизм у микроорганизмов невозможно, часто он может возникать по причине нестабильности генома у многих РНК-содержащих вирусов [4]. Чтобы избежать ошибок, используют праймеры, специфичные в отношении консервативных участков генома, или два набора праймеров, или "гнездовые" праймеры, когда матрицей является небольшой участок ДНК, амплифицированный в ходе первой ПЦР-реакции, а во второй ПЦР-реакции применяют праймеры, расположенные между первыми последовательностями-мишенями [1].

Обычно в ПЦР используют ДНК-полимеразу, выделенную из *Thermus aquaticus*, которая обеспечивает надлежащий уровень точности данной реакции.

В задачу наших исследований входило изучение влияния различных режимов замораживания и хранения в условиях умеренно низких температур ($-18\div-30^{\circ}\text{C}$) и в жидком азоте (-196°C) на сохранность нуклеотидных последовательностей РНК производственных и эпизоотических

штаммов вируса диареи крупного рогатого скота (ВД КРС).

По современной классификации вирус диареи крупного рогатого скота относится к семейству *Flaviviridae*, роду пестивирусов. Вирус, как правило, поражает молодых животных, а также вызывает самопроизвольные аборт у стельных коров [3].

Материалы и методы

Были исследованы производственные штаммы ВД КРС "Орегон-С24V" и эпизоотические "УНИИЭВ-25" предоставленные Научно-исследовательским институтом экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН. Продолжительность хранения вирусов в условиях умеренно низких температур ($-18\div-30^{\circ}\text{C}$) составляла от 13 месяцев до 12 лет, а в жидком азоте (-196°C) от 7 месяцев до 3 лет.

ПЦР-тесты проводили в отделе вирусологии Государственного ветеринарного института г. Пулаву (Польша) по договору о творческом сотрудничестве. После хранения в жидком азоте и при умеренно низких температурах вирусные штаммы культивировали в течение трех суток на клеточной культуре MDBK с добавлением 10% лошадиной сыворотки в атмосфере с 4% CO_2 при температуре 37°C . Цитопатическое действие вируса на клеточную культуру наблюдалось по истечении трех суток, после чего культуральные сосуды хранили в холодильнике при -70°C . Экстракция полной РНК была выполнена после размораживания культуры с помощью TRI (Total RNA Isolation System) фирмы Sigma по стандартной методике [2]. При проведении обратной транскрипции РНК и цепной полимеразной реакции (ОТ-ПЦР) синтез первой цепи комплементарной ДНК (к-ДНК) на вирусной РНК осуществляли используя РНК-зависимую ДНК-полимеразу из вируса миелобластома птиц (AMV) по общепринятой методике [1].

Амплификация к-ДНК проводилась с применением специфичных для каждого вируса праймеров при оптимальных условиях. Для ВД ПЦР проводили со следующими праймерами (таблица)

324F: ATG CCC (T/A)TA GTA GGA CTA GCA
 326R: TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC
 188F: GTA GTC GTC AGT GGT TCG
 366R: GCC ATG TAC AGC AGA GAT

Адрес для корреспонденции: Стегний М.Ю., Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская, 53, г. Харьков, Украина 61002; тел.: +38 (0572) 47-16-82, факс: +38 (0572) 47-01-64

Таким образом, амплификации подвергались сегменты генома длиной 287 пар нуклеотидов и 195 нуклеотидов. Всего было проведено 30 циклов ПЦР с параметрами. Амплифицированные последовательности обнаруживали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. При определении полиморфизма рестрикционных фрагментов использовали три энзима рестрикции: Ava I (производства “New England Biolab”), Pst I (фирмы “Fermentas”), Xho I (производства “Promega”). Рестрикцию проводили при температуре 37°C в течение 60 минут. Параметры электрофореза, проведенного после рестрикции: 600 В, 25 мА, 15 Вт.

Результаты и обсуждение

После проведения первого пассажа вирусов, хранившихся при умеренно низких температурах в течение 12 лет, на клеточных культурах цитопатического эффекта не наблюдалось. Эти образцы повторно пассировали на перевиваемых клетках MDBK, в которых отмечалось проявление заметного цитопатического эффекта спустя 3 суток после инфицирования. Однако последующее проведение ОТ-ПЦР не привело к получению продуктов амплификации. Поэтому была предпринята попытка реамплификации к-ДНК методом гнездовой ПЦР с внутренними праймерами 188F-366R. Для этого использовали к-ДНК из первой ПЦР, проводившейся со стартерами 324F - 326R. Вновь была выполнена экстракция вирусной РНК из тех же образцов, а также из штаммов, хранившихся 16 (“Орегон-С24V”) и 13 месяцев (“УНИИЭВ-25”) при умеренно-низких температурах с последующим проведением ПЦР с праймерами 324F - 326R. Продукты ПЦР не были получены, это удалось лишь при последующем использовании этой же реакционной смеси с праймерами 188F-366R. Размер полученного продукта составил при этом 195 пар нуклеотидов.

Результаты изучения полиморфизма рестрикционных фрагментов (RFLP) вирусных штаммов, хранившихся в условиях умеренно-низких температур, представлены на рис. 1. Все 4 изолята ВД КРС дали идентичное разделение с ферментом Ava I. Был получен фрагмент длиной около 160 пар нуклеотидов для всех анализируемых штаммов. Фрагмент длиной 37 пар оснований мигрировал из

Применявшиеся праймеры, их локализация, ПЦР-профили

Праймеры	Локализация	Продукты	ПЦР профиль
324F – 326R	108 – 395 н. посл.	287 пар нукл.	94°C – 10", 56°C – 30", 68°C – 30" = 30x
188F – 366R	188 – 383 н. посл.	195 пар нукл.	94°C – 10", 50°C – 45", 68°C – 45" = 30x

При применении рестриктазы Pst I подтверждено наличие рестрикционной точки путем получения фрагмента из 153 нуклеотидов для всех штаммов разного срока хранения, это означает, что все исследованные вирусные штаммы относятся к первому генотипу ВД КРС.

Использование фермента рестрикции Xho I позволило получить ожидаемый фрагмент длиной около 159 пар оснований также для всех исследованных образцов, подтвердило специфичность продукта ОТ ПЦР из некодируемого участка с конца 5' UTR генома ВД КРС. При этом фрагмент, состоявший из 36 пар оснований, мигрировал из геля.

Идентичность наблюдаемых профилей рестрикционного анализа исследованных вирусных штаммов связана с высоким консерватизмом участка с конца 5' UTR в геноме ВД КРС, что свидетельствует о том, что хранение в условиях умеренно низких температур в течение 13 месяцев и 12 лет не привело к изменениям в консервативном участке геномов ВД КРС.

Штаммы “Орегон-С24V” и “УНИИЭВ-25”, замороженные путем быстрого погружения в жидкий азот и хранившиеся в нем в течение семи месяцев и трех лет соответственно также прошли ПЦР-тесты. При этом с праймерами 324F-26R продукты амплификации не были получены. Использование к-ДНК из первой реакции с внешними праймерами и ее реамплификация с внутренними 188F- 66R праймерами позволило получить продукт величиной 195 пар нуклеотидов.

Анализ изучения полиморфизма рестрикционных фрагментов штаммов, замороженных и хранившихся в условиях жидкого азота, свидетельствует о том, что в каждом случае было подтверждено наличие недопереваренных фрагментов ДНК. Это означает, что было использовано слишком много ДНК, можно было проводить переваривание дольше, но удалось получить ожидаемые фрагменты (рис. 2). При этом результаты RFLP аналогичны полученным при хранении штаммов в условиях умеренно низких температур.

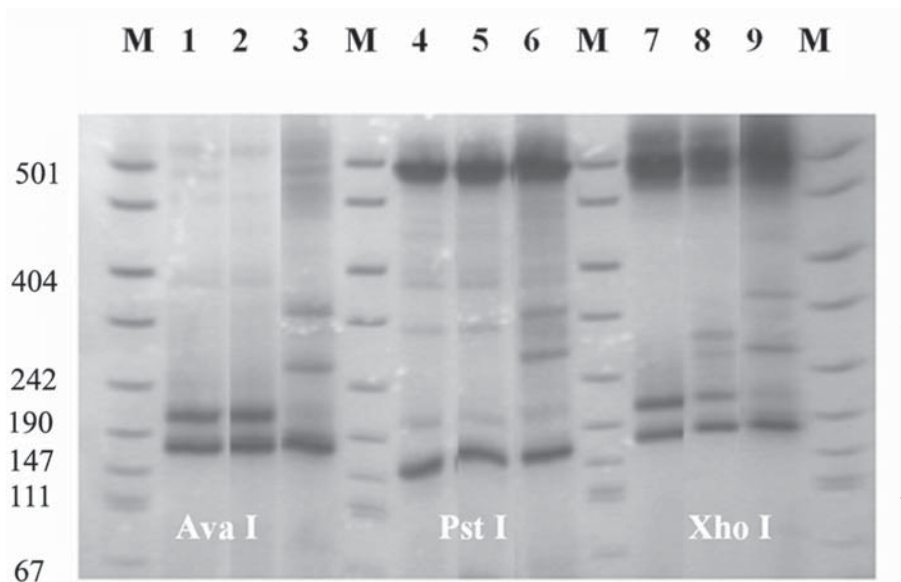


Рис. 1. Результаты RFLP штаммов, хранившихся в условиях умеренно-низких температур: М – маркер 67-501 пар нуклеотидов; №1, 7, 13 – “Орегон С 24 V” от 25.01.92; № 2, 8, 14 – “Орегон С 24 V” от 29.12.02; № 3, 9, 15 – “УНИИЭВ-25” от 5.02.92; № 4, 10, 16 – “УНИИЭВ-25” от 11.02.03; № 5, 11, 17 – Польские изоляты ВД КРС; № 6, 12, 18 – Польские изоляты ВД КРС.

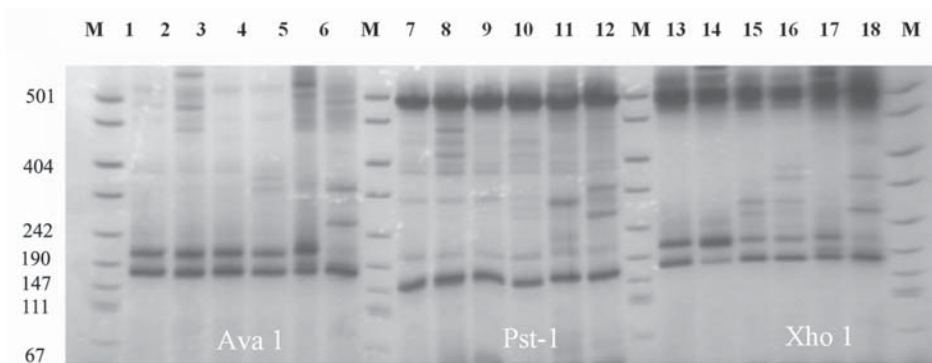


Рис. 2. Результаты RFLP штаммов, хранившихся в условиях жидкого азота: М – маркер 67-501; №1, 4, 7 – “Орегон-С24V”; №2, 5, 8 – “УНИИЭВ-25”; №3, 6, 9 – Польские изоляты.

Выводы

Полученные в ходе проведенных исследований данные позволяют сделать вывод о том, что в процессе замораживания и хранения исследованных вирусных штаммов как в условиях умеренно низких температур, так и жидком азоте происходит деградация вирусной РНК, поскольку продукты ОТ-ПЦР были получены только с праймерами длиной 195 пар нуклеотидов (188F-366R), а с внешними праймерами длиной 287 пар нуклеотидов (324F-326R) продуктов реакции не удалось получить ни в одном случае.

В наиболее консервативном участке генома ВД КРС (5'-нетранслируемая область) не происходит изменений последовательностей РНК в процессе хранения при всех исследованных режимах. Все исследованные штаммы относятся к первому генотипу ВД КРС.

Литература

1. *Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных методом полимеразной цепной реакции* / Под ред. А.А. Гусева, А.Н. Панина. – Владимир: ВНИИЖЗ, 1998. – 519 с.

2. *Молекулярная клиническая диагностика*. Методы: Пер. с англ. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.
3. *Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В.* Вирусные болезни животных. – М., 1998. – 928 с.
4. *Eisenstein V.I.* / *New Engl. J. Med.* – 1990. – 322. – P. 178.