

К. В. КУДИН, П. П. КРАСОЧКО, В. А. ПРОКУЛЕВИЧ

ПОЛУЧЕНИЕ ФРАГМЕНТА ГЕНОМА ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Вирус диареи крупного рогатого скота – экономически важный патоген, инфицирующий главным образом животных из подотряда жвачных. Проанализированы последовательности геномов 89 штаммов вируса диареи крупного рогатого скота (1-го и 2-го типов) из базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank. На основе результатов множественного выравнивания последовательностей геномов отобранных штаммов по программному алгоритму Clustal Omega построена консенсусная последовательность генома, на базе которой разработана пара вырожденных праймеров, использованных в работе для амплификации области генома вируса из образца лиофилизированной коммерческой вакцины. Поскольку целевой фрагмент является весьма вариабельной последовательностью, в конструкции праймеров использована технология LNA-нуклеотидов для повышения их сродства к матрице. Амплифицированный фрагмент генома был клонирован в векторе pUC18 и секвенирован. Результаты анализа сиквенса подтвердили принадлежность клонированной последовательности к геному BVDV 2-го типа и наличие фрагмента открытой рамки трансляции, кодирующего гликопротеин E2 внешней оболочки вириона.

Ключевые слова: вирус диареи крупного рогатого скота; ПЦР; праймер; клонирование; секвенирование; pUC18.

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is the denomination of an economically important pathogen that primarily infects ruminants. A group of 89 bovine viral diarrhoea virus strain genomes (type 1 and 2) from the GenBank sequence database were analyzed to obtain a BVDV genome consensus by means of the multiple sequence alignment tool using Clustal Omega algorithm. Based on the consensus built two degenerate primers were constructed to isolate from the commercial lyophilized vaccine sample the genome part coding BVDV envelope glycoprotein E2. The LNA technology was used to generate the cloning primer pair, because of the high variability of the sequence to be cloned. The amplified fragment was ligated into the cloning pUC18 vector and sequenced. The strain was concluded to belong to the BVDV type 2 genotype based on the high sequence similarity to this type of virus.

Key words: BVDV; PCR; primer; cloning; sequencing; pUC18.

Вирусная диарея крупного рогатого скота (КРС) – инфекционное заболевание, вызываемое гетерогенной группой вирусов BVDV (Bovine Viral Diarrhoea Virus) из рода *Pestivirus* и семейства *Flaviviridae* [1]. В настоящее время на основе генетических и серологических исследований в данной группе выделяют два вида – BVDV-1 и BVDV-2 [2, 3], каждый из которых в зависимости от оказываемого литического действия на инфицированную клетку может быть представлен цитопатогенным либо нецитопатогенным вариантом [4]. На молекулярно-биологическом уровне данные различия обусловлены рекомбинационными либо мутационными процессами в геноме вируса, которые изменяют характер экспрессии закодированных белковых последовательностей, что (по не до конца изученному механизму) приводит к конверсии нецитопатогенного фенотипа в цитопатогенный вариант [5]. Наиболее опасная ситуация для популяции – появление носителей персистирующей инфекции, которые в самых тяжелых случаях составляют 1–2 % особей стада, при этом 60–80 % особей оказываются серопозитивными, в связи с этим вирусы группы BVDV – это экономически важные патогены КРС, причиняющие значительные убытки в животноводстве по всему миру [6].

Геном BVDV представлен смысловой цепью РНК длиной около 12,3 тыс. нуклеотидов, которая является одной огромной открытой рамкой трансляции (ОРТ), фланкированной нетранслируемыми участками с регуляторными элементами. ОРТ в типичном случае кодирует гипотетический полипротеин около 3900 аминокислотных остатков, который преобразуется ко- и посттрансляционно в 11–12 полноценных белков, поддерживающих жизненный цикл вируса [5]. Вирион BVDV размером 40–60 нм представляет собой нуклеокапсид (из белка С) с заключенной внутри геномной РНК, окруженный липидной оболочкой со структурными вирусными гликопротеинами E^{ns}, E1 и E2 [5]. Наибольший интерес представляет гликопротеин E2, поскольку согласно исследованиям именно он является иммунодоминантным антигеном в структуре вириона, обеспечивающим образование сильных нейтрализующих антител [7]. Поэтому целью данной работы стала разработка системы амплификации и клонирования фрагмента открытой рамки трансляции генома BVDV, кодирующего гликопротеин E2 внешней оболочки вириона, для дальнейшего изучения потенциала данного белка в качестве компонента диагностических систем и вакцинных препаратов.

Материал и методика*Бактериальные штаммы, плазмиды и праймеры*

Бактерии штамма *E. coli* XL-1 Blue (F[']::Tn10 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) glnV44 relA1 lac) из коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ использовали для клонирования рекомбинантных векторов.

Вектор pUC18 (Ap^r, lacPOZ[']) использовали для клонирования амплифицированной области генома BVDV, кодирующей гликопротеин E2, а также с целью секвенирования нуклеотидной последовательности полученной вставки.

Для выделения РНК использовали ряд образцов, предоставленных Учреждением образования «Витебская ордена “Знак Почета” государственная академия ветеринарной медицины» (УО ВГАВМ),

в частности группу образцов на основе производственного вакцинного штамма BVDV (инфицированные клетки линии MDBK и вирусный супернатант, собранные через 24–48 ч после инфекции, свежие либо однократно замороженные; лиофилизат вирусного супернатанта), а также коммерческую лиофилизированную вакцину Бови-Шилд Голд FP5 фирмы Pfizer (серия A063379B от 12-2010).

В качестве положительного контроля реакции обратной транскрипции брали тотальную РНК, выделенную из клеток линии СПЭВ, и соответствующие праймеры к глицеральдегидфосфат-дегидрогеназе, обозначенные в приведенной ниже таблице как GAPDH-F и R.

Сконструированные праймеры F-BVDV-LNA, R-BVDV-LNA, GAPDH-F и GAPDH-R синтезированы фирмой «Праймтех» (Беларусь), основные их характеристики приведены в таблице (размеры ожидаемых ампликонов указаны приблизительно и в зависимости от конкретного генотипа могут различаться по длине на несколько нуклеотидов). В соответствии с общепринятым международным обозначением знак «+» стоит перед LNA-нуклеотидами.

Основные параметры разработанных праймеров

Праймер	Сиквенс 5'→3'	Размер, нт	Вырожденность	GC, %	Ампликон, п. о.
F-LNA	GTCTGYAT+AAGACCRG+AYTGGTGGCC	26	8	55,8	~ 1393
R-LNA	CCG+TGTG+TYARCAART+TGCCYATCAT	26	16	46,2	
GAPDH-F	CCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGATCCC	29	0	58,6	~ 590
GAPDH-R	GGCCCTCGGACGCCTGCTTACCAC	25	0	72,0	

Генно-инженерные методики и ферменты

Тотальную РНК из образцов клеток, лиофилизата или преципитата вирусного супернатанта выделяли с помощью реактива TRI Reagent® (Sigma) в соответствии с инструкцией производителя. Качество, чистоту и концентрацию выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометрии (при длинах волн 230, 260, 280 и 325 нм) [8] и модифицированного денатурирующего электрофореза в агарозном геле с использованием ТАЕ-буфера [9].

Вирусный преципитат получали по методике осаждения вирусов полиэтиленгликолем (молекулярная масса 6000), описанной для семейства *Togaviridae* [10], в связи с идентичными физико-химическими свойствами их вирионов с BVDV семейства *Flaviviridae*.

Для изучения термодинамических параметров конструируемых праймеров использовали программное обеспечение OligoAnalyzer 3.1 фирмы Integrated DNA Technologies и ряд приложений на сервере DINAmelt [11].

Проведение Ca²⁺-зависимой трансформации и электрофорез ДНК осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами [12]. В работе были использованы ферменты и буферные системы фирмы ThermoScientific, в частности для реакции обратной транскрипции (ОТ) использовали фермент RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase (с праймером R-BVDV), для полимеразной цепной реакции (ПЦР) – фермент *Pfu* DNA Polymerase. Все ферментативные реакции осуществляли в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР проводили с использованием программируемого амплификатора Veriti™ фирмы Applied Biosystems. Параметры циклов амплификации: первичная денатурация – 1 мин при 94 °С, затем 30 циклов: денатурация – 15 с при 94 °С, отжиг праймеров – 30 с при 68 °С, элонгация – 3 мин при 72 °С, заключительная полимеризация – 10 мин при 72 °С. Секвенирование фрагмента генома BVDV, клонированного в составе вектора pUC18, осуществляла фирма Integrated DNA Technologies с помощью стандартных праймеров к данному вектору.

Процедуру очистки ДНК от ферментов и солей после этапов амплификации, лигирования, рестрикции и электрофореза осуществляли с помощью набора реактивов QIAquick Gel Extraction Kit фирмы Qiagen, рекомбинантную векторную ДНК выделяли из клеток *E. coli* с использованием реактивов QIAprep Spin MiniPrep Kit фирмы Qiagen.

Компьютерную обработку данных и множественное выравнивание последовательностей геномов BVDV производили при помощи программного обеспечения Clustal Omega (версия 1.2.0), параметры выравнивания выставлялись по умолчанию.

Результаты и их обсуждение

При разработке схемы клонирования отсутствовала достоверная информация о конкретном типе вируса BVDV в доступных источниках матрицы, поэтому было решено сконструировать праймеры, позволяющие относительно эффективно амплифицировать требуемый фрагмент из геномов обоих типов. Для этого отбирались последовательности 89 полных геномов преимущественно нецитопатогенных штаммов вируса BVDV 1-го и 2-го типов, размещенных в базе данных нуклеотидных последовательностей GenBank. После множественного выравнивания полученной группы сиквенсов по программному алгоритму Clustal Omega построили консенсусную последовательность генома BVDV, на основании

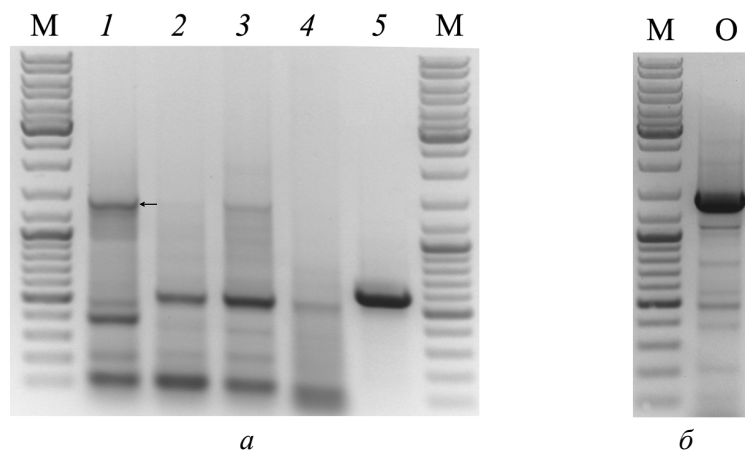
которой выбрали два относительно консервативных участка, максимально приближенных к области, кодирующей гликопротеин E2 внешней оболочки вириона. В пределах данных участков подбирали пару праймеров для амплификации целевого фрагмента по очевидным причинам, 3'-концы праймеров располагались в наиболее консервативных группах оснований. В части позиций допускалось вырождение в соответствии со структурой матричной последовательности (см. таблицу, вырожденные основания обозначены латинскими буквами согласно правилам ИЮПАК). Чтобы свести вырожденность к минимуму и тем самым повысить эффективную концентрацию праймеров в процессе амплификации мишени, при наличии нуклеотидных замен в какой-либо позиции области отжига праймера менее чем в 10 % всех проанализированных последовательностей, использовался наиболее распространенный нуклеотид. Таким образом, допускалась возможность того, что часть оснований праймера окажется некомплементарной матрице, при этом количество потенциально неспаренных оснований в одном праймере в худшем случае не превышало двух, и они располагались преимущественно в 5'-половине праймеров (или не ближе 5 нуклеотидов от 3'-конца). В участках расположения инвариантных оснований для повышения эффективности и специфичности реакции амплификации использовали LNA-нуклеотиды, размещенные в соответствии с приведенными в литературе рекомендациями [13, 14] и таким образом, чтобы по возможности не участвовать в образовании нежелательных вторичных структур или димеров праймеров. Для учета влияния нуклеотидов LNA на конечную температуру отжига праймеров использовались термодинамические параметры, приведенные на сайте фирмы Exiqon [15, 16]. Расчетный диапазон температур отжига полученной смеси праймеров составил 55–65 °С, максимальная температура плавления вероятного димера 25 °С, максимальная температура плавления возможной вторичной структуры 62,4 °С, что может понизить эффективность отжига для части праймеров, однако вторичных самокомплементарных структур, потенциально способных к элонгации, обнаружено не было.

В качестве источника матрицы для реакции обратной транскрипции использовалась тотальная РНК из ряда образцов, которые можно условно разделить на две группы. К первой группе относятся элементы производства вакцинного препарата из УО ВГАВМ – инфицированные штаммом BVDV клетки линии MDBK, лиофилизированный вирусный супернатант либо вирионы, осажденные из вирусного супернатанта с помощью полиэтиленгликоля. Ко второй группе относятся коммерческие вакцины, в частности Бови-Шилд Голд FP5 фирмы Pfizer.

Несмотря на сопоставимое качество всех образцов выделенной РНК, которое косвенно и в определенной степени субъективно оценивалось по данным спектрофотометрии и электрофореза в денатурирующих условиях на основании таких критериев, как концентрация, чистота (отсутствие примесей белков или органических растворителей фенольного ряда) и целостность молекулы РНК, рабочая кДНК-матрица была получена только из пробы лиофилизированной вакцины Бови-Шилд Голд FP5. Результаты амплификации различных образцов приведены на рисунке (фрагмент а). Возможными причинами отсутствия амплификации в остальных образцах могут быть низкое качество использованной пробы или выделенной матрицы РНК, неоптимальная конструкция праймеров, а также, поскольку используемый для производства вакцины штамм является цитопатогенным биотипом вируса BVDV, не исключается возможность генетической перестройки его генома, препятствующей образованию требуемой матрицы.

Для оптимизации реакции амплификации целевого фрагмента генома BVDV проверялся широкий температурный диапазон отжига 40–72 °С, различная концентрация праймеров (0,25–2,0 мкМ), разное соотношение реакционной смеси обратной транскрипции (матрицы) к ПЦР смеси, а также некоторые добавки, способные повысить качество и эффективность синтеза целевого фрагмента (глицерин и бычий сывороточный альбумин (БСА)). Оптимизация проводилась только по отношению к матрице кДНК Бови-Шилд Голд FP5 с целью определения условий реакции, позволяющих наработать достаточное для клонирования количество нужного фрагмента. Наибольшее влияние на выход целевого продукта оказала температура отжига (лучшее соотношение количества целевого продукта к неспецифическим продуктам реакции наблюдалось при 68 °С) и концентрация праймеров (влияет, главным образом, на количество продукта, оптимальное значение 1 мкМ). В меньшей степени имеет значение соотношение объемов ОТ смеси к ПЦР смеси (наблюдается выраженное ингибирование реакции амплификации компонентами ОТ смеси в случае добавления более 1 мкл матрицы на каждые 25 мкл ПЦР смеси; как правило, использовалось 0,5 мкл ОТ смеси к 25 мкл ПЦР смеси). Добавление в смесь БСА (до концентрации 10–50 мкг/мл) или глицерина (до концентрации 1–5 %) не оказало заметного влияния. Результаты оптимизации реакции амплификации для матрицы кДНК FP5 приведены на рисунке (фрагмент б).

Клонирование амплифицированного фрагмента в вектор pUC18 проводили по тупым концам, образованным рестриктазой *Sma*I со стороны вектора и полимеразой *Pfu* со стороны вставки. Перед ампли-



Аmplification фрагмента генома BVDV после реакции обратной транскрипции:

а – амплификация к ДНК, полученной на матрицах РНК различных образцов:

1 – Бови-Шилд Голд FP5, виден целевой фрагмент размером 1393 п. о.; *2* – лиофилизат вирусного супернатанта;

3 – осажденные ПЭГом вирусные частицы; *4* – тотальная РНК из клеток, инфицированных BVDV;

5 – положительный контроль ОТ, виден ожидаемый фрагмент размером 590 п. о.;

б – результат оптимизации условий амплификации целевой матрицы:

О – амплификация матрицы кДНК Бови-Шилд Голд FP5 при оптимальных условиях;

М – маркеры молекулярного веса GeneRuler™ DNA Ladder Mix #SM0333 (ThermoScientific)

фикацией праймеры были фосфорилированы с помощью полинуклеотидкиназы фага T4, а разрезанный вектор дефосфорилировался щелочной фосфатазой, таким образом повышалась вероятность получения рекомбинантных молекул после лигирования. Положительные клоны – трансформанты штамма *E. coli* XL1-Blue – отбирались на селективной среде X-gal/ИПТГ. После проведения дополнительного ПЦР-скрининга на наличие вставки в векторе pUC18 с помощью стандартных коммерческих праймеров векторная ДНК одного из положительных клонов выделялась и в дальнейшем использовалась для секвенирования вставки.

По результатам секвенирования было сделано заключение, что клонированная последовательность принадлежит вирусу BVDV 2-го типа. Уровень гомологии с полноразмерными геномами вируса 2-го типа находится в диапазоне 89–98 % на значительном протяжении последовательности (более 77 %), наиболее близкородственные штаммы (97–98 % гомологии) представлены в США и Канаде. Для вируса 1-го типа гомология находится на уровне 66–70 % на отрезках, составляющих 55–96 % размера последовательности.

Результаты секвенирования клонированного фрагмента генома BVDV помещены в базу данных нуклеотидных последовательностей GenBank (№ KJ146971).

Таким образом, осуществлено клонирование и секвенирование фрагмента генома BVDV 2-го типа, кодирующего ген гликопротеина E2 внешней оболочки вириона, сиквенс фрагмента отправлен в базу данных нуклеотидных последовательностей GenBank. Данная работа является базой для дальнейшего изучения возможности гетерологичной экспрессии рекомбинантного белка E2 в штаммах *E. coli* и перспективы его использования в качестве компонента диагностических систем и вакцинных препаратов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Collett M. S., Anderson D. K., Retzel E. Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae // *The J. of general virology*. 1988. Vol. 69. P. 2637–2643.
2. Ridpath J. F., Bolin S. R., Dubovi E. J. Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into Genotypes // *Virology*. 1994. Vol. 205, № 1. P. 66–74.
3. Pellerin C., Van Den Hurk J., Lecomte J., Tijssen P. Identification of a New Group of Bovine Viral Diarrhea Virus Strains Associated with Severe Outbreaks and High Mortalities // *Virology*. 1994. Vol. 203, № 2. P. 260–268.
4. McClurkin A. W., Bolin S. R., Coria M. F. Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea // *J. of the American Veterinary Medical Association*. 1985. Vol. 186, № 6. P. 568–569.
5. Meyers G., Thiel H.-J. Molecular Characterization of Pestiviruses // *Adv. Virus Res.* 1996. Vol. 47. P. 53–118.
6. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections // *Veterinary Microbiology*. 1999. Vol. 64, № 2/3. P. 89–107.
7. Donis R. O., Corapi W., Dubovi E. J. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein // *The J. of general virology*. 1988. Vol. 69 (pt. 1). P. 77–86.

8. Gallagher S. R. Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy // Current Protocols in Molecular Biology. 2011. Suppl. 93. App. 3D.

9. Masek T., Vopalensky V., Suchomelova P., Pospisek M. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels // Analytical Biochemistry. 2005. Vol. 336, № 1. P. 46–50.

10. Mahy B. W. J. Virology: a practical approach. Oxford ; Washington (DC), 1985.

11. Markham N. R., Zuker M. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction // Nucleic acids research. 2005. Vol. 33, № Web server issue. P. W577–81.

12. Sambrook J., Russell D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2001.

13. Ballantyne K. N., van Oorschot R. A. H., Mitchell R. J. Locked nucleic acids in PCR primers increase sensitivity and performance // Genomics. 2008. Vol. 91, № 3. P. 301–305.

14. Levin J. D., Fiala D., Samala M. F., Kahn J. D., Peterson R. J. Position-dependent effects of locked nucleic acid (LNA) on DNA sequencing and PCR primers // Nucleic Acids Research. 2006. Vol. 34, № 20. P. E142–e142.

15. McTigue P. M., Peterson R. J., Kahn J. D. Sequence-Dependent Thermodynamic Parameters for Locked Nucleic Acid (LNA)–DNA Duplex Formation // Biochemistry. 2004. Vol. 43, № 18. P. 5388–5405.

16. Kaur H., Arora A., Wengel J., Maiti S. Thermodynamic, Counterion, and Hydration Effects for the Incorporation of Locked Nucleic Acid Nucleotides into DNA Duplexes // Biochemistry. 2006. Vol. 45, № 23. P. 7347–7355.

Поступила в редакцию 14.01.2014.

Кирилл Валерьевич Кудин – младший научный сотрудник НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии.

Павел Петрович Красочко – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО «Витебская ордена “Знак Почета” государственная академия ветеринарной медицины».

Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии.