

АМПЛІКАЦІЯ ТА АНАЛІЗ НУКЛЕОТИДНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ГЕНІВ VP2 ТА NS ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ, ВИДІЛЕНОГО В ЗАХІДНІЙ УКРАЇНІ

Ю.П. Рудь, М.І. Майстренко, Л.П. Бучацький

Інститут рибного господарства НААН України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Вступ

Вірус інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) – це простий вірус з роду *Aquabirnavirus* родини *Birnaviridae*, який викликає висококонтагіозне захворювання у лососевих видів риби. Діаметр віріонів складає 60 нм. IPNV складається з п'яти поліпептидів та двох сегментів дволанцюгової РНК. На сьогоднішній день виділено дев'ять серотипів цього вірусу [1]. IPNV широко розповсюджений в усьому світі і в умовах аквакультури призводить до значних економічних збитків, які становлять 40-70%. Найчутливішими видами до цього вірусу є атлантичний лосось (*Salmo salar*), райдужна форель (*Onchorhynchus mykiss*) та голец (*Salvelinus fontinalis*) [2]. З початком активного розвитку лососевництва в Україні ситуація з розповсюдженням та походженням IPNV в природних водоймах та рибогосподарських підприємствах досліджена недостатньо. В 2011 році IPNV був виділений в Україні від райдужної форелі *O. mykiss* з річки Сірет, Чернівецької області [3]. За останні 5 років IPNV був ізолюваний у республіках Польщі, Словаччини та Чехії [4]. З огляду на тісну співпрацю українських форелевих господарств з рибогосподарськими підприємствами з вище наведених країн, існує припущення, що вірус міг бути завезений в Україну з заплідненою ікрою з господарств Східної Європи. Одним з основних молекулярних методів ідентифікації IPNV є ампліфікація РНК вірусу за допомогою зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР).

Тому метою нашої роботи було підібрати олігонуклеотидні праймери, специфічні до українського ізоляту IPNV та оптимізувати параметри постановки реакції. До того ж, оскільки в Європі поширеними є одразу декілька штамів IPNV, з метою встановлення приналежності українського ізоляту ми проаналізували нуклеотидні послідовності ампліфікованих фрагментів геному IPNV, виділеного в Україні.

Матеріали та методи дослідження

Відбір, приготування та зберігання патологічного матеріалу, а також накопичення вірусу в культурі клітин проводили відповідно до міжнародних нормативних документів [5]. Накопичення ізоляту IPNV “Карпати” проводили на культурі клітин RTG-2 (гонади райдужної форелі). Клітини культивували при температурі 20°C в поживному середовищі MEM (PAA, Австрія) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки FBS Gold (PAA, Австрія) та антибіотиків (гентаміцин). Культивування культури клітин RTG-2 здійснювали відповідно до авторських рекомендацій [6]. У роботі використовували гомогенати внутрішніх органів цьоголіток райдужної форелі *O. mykiss*, відібраних для дослідження з річки Сірет в Чернівецькій області [3]. Для цього готували гомогенати внутрішніх органів на поживному середовищі MEM в співвідношенні 1:10. Матеріал для інокуляції фільтрували через шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм (Sarstedt). Для інфікування клітин використовували 1 мл приготовленого інокулята. Після настання цитопатичної дії (ЦПД) та деструкції моношара клітин, культуральну рідину використовували для виділення РНК вірусу.

Для виділення РНК IPNV використовували набір GenJet™ RNA Purification Kit (Thermo Scientific). Для синтезу кДНК з отриманих препаратів РНК використовували набір RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific).

Для підбору олігонуклеотидних праймерів до українського ізоляту IPNV, визначення їхньої специфічності та фізичних властивостей використовували програмне забезпечення Vector NTI 10. Крім того, специфічність праймерів перевіряли за допомогою онлайн-сервісу BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Ампліфікацію здійснювали з використанням трьох пар олігонуклеотидних праймерів, специфічних до генів VP2 та NS.

Ампліфікацію проводили на термоциклері “96 Universal Gradient PEQ STAR” (PEQLAB, Німеччина). До складу реакційної суміші входили наступні компоненти: 12,5 мкл DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), олігонуклеотидні праймери (Metabion, Німеччина) по 1 мкл кожного (20 пмоль/мкл), 2 мкл кДНК та стерильна деіонізована вода до загального об'єму 25 мкл. Ампліфікація складалась з 1 циклу інкубації при 50°C 15 хвилин, циклу попередньої денатурації при 94°C (3 хвилини) та 35 циклів денатурації при 94°C (30 секунд), відпалу праймерів при градієнті температур 53-64°C (30 секунд), синтезу при 72°C (1 хвилини) та до-

даткового останнього циклу синтезу при 72°C (7 хвилин). Після ПЛР продукти аналізували у 2%-му агарозному гелі в TAE-буфері (40 мМ TRIS-HCl, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ ЕДТА). Результати електрофору спостерігали під ультрафіолетовим транслюмінатором.

Виділення ДНК з гелю здійснювали за допомогою набору Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) відповідно з протоколом виробника. Ампліфіковані фрагменти досліджували на автоматичному ДНК-секвенаторі Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems) з використанням набору для секвенування BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Аналіз послідовностей нуклеотидів проводили за допомогою алгоритмів ClustalW в програмному забезпеченні MEGA 5.2 та BLASTN.

Отримані результати та їх обговорення

Проаналізувавши літературні дані, було встановлено, що найефективнішими ділянками РНК вірусу IPNV для підбору олігонуклеотидних праймерів і специфічної ампліфікації є ділянки, що кодують структурний білок VP2 та неструктурний білок NS. Але, оскільки у Європі поширеними є одразу декілька штамів цього вірусу (Ab, Sp, Te та He), які розрізняються за антигенними детермінантами структурних білків, і, відповідно за нуклеотидними послідовностями РНК які їх кодують, ми обрали за основу нуклеотидні послідовності неструктурного білка NS та консервативну ділянку структурного білка VP2, які є найменш варіабельними. Для ампліфікації цих фрагментів сегменту А РНК українського ізоляту IPNV ми використали нами модифіковані праймери IPN, PrD та WB, рекомендовані Pryde et al. (1993), Blake et al. (1995) та Williams et al. (1999) [7-9].

Як показали результати наших досліджень, обрані олігонуклеотидні праймери, специфічні до ділянок генів неструктурного білку NS та структурного білку VP2 IPNV, ампліфікували очікувані за розміром фрагменти кДНК. Розмір ампліконів становив для праймерів IPN 620 пар нуклеотидов (п.н.), для WB близько 200 п.н., а фрагмент довжиною 175 п.н. був характерний для праймерів PrD (рис. 1).

За допомогою градієнтного ампліфікатора була проведена оптимізація постановки ПЛР. Для відпалу праймерів використовували діапазон температур від 53 до 64°C. Було показано, що температура 60°C є оптимальною для всіх досліджуваних пар праймерів. Також шляхом 10-кратних розведень препаратів кДНК перевіряли ефективність досліджуваних пар праймерів. Як показали результати дослідження, найбільшу працездатність демонстрували праймери WB, які є універсальними для всіх генотипів IPNV та інших водних бір-

навірусів. Аналогічна ефективність спостерігалась для праймерів PrD, але як запевняють автори цих олігонуклеотидів, вони не здатні діагностувати деякі штами IPNV [8]. Найнижча ефективність була характерна для праймерів IPN, реакція проходила тільки в зразках з високою концентрацією вірусної РНК. На специфічність праймерів IPN може впливати той факт, що реверс-праймер комплементарний варіабельній N-кінцевій частині білка VP2.

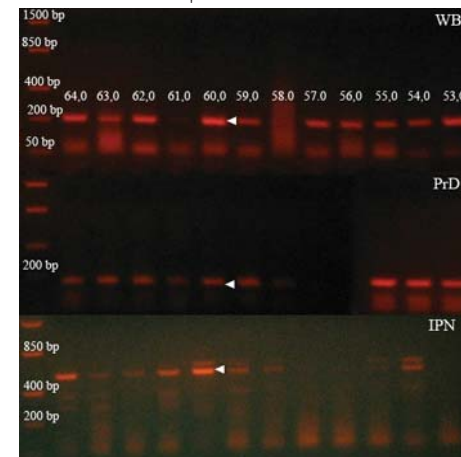
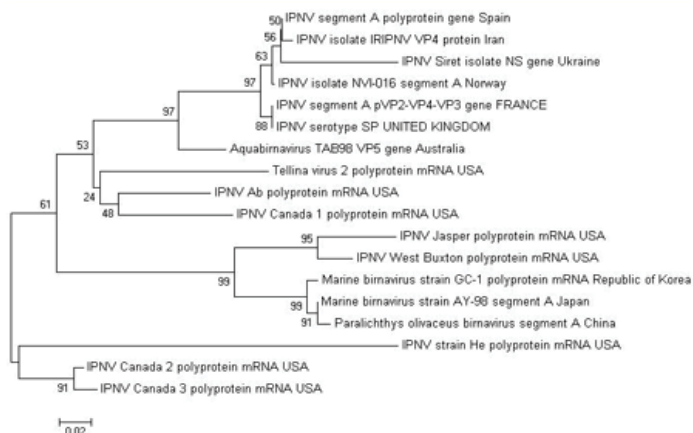
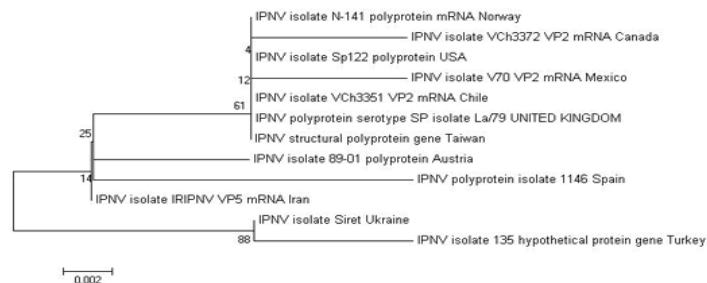


Рис. 1. Ампліфікація фрагментів генів VP2 (праймери IPN та WB) та NS (праймери PrD) українського ізоляту "Карпати" IPNV. Найкращий результат показано ◀; зліва нанесено ДНК маркер FastRuler™ (Thermo Scientific); діапазон температур відпалу праймерів складав 53-64°C.

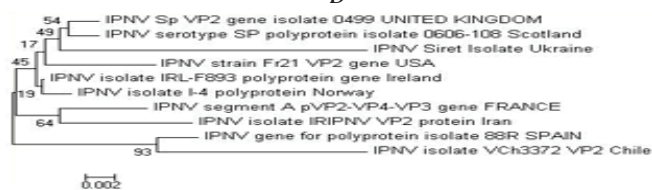
Нуклеотидні послідовності трьох ампліфікованих фрагментів сегменту А українського ізоляту IPNV "Карпати" (150 п.н. для гена NS та 175 і 480 п.н. для N- и С-кінцевих ділянок гена VP2 відповідно) були аналізовані в автоматичному ДНК-секвенаторі Genetic Analyser 3130. Як показали результати наших досліджень, український ізолят IPNV належить до штаму Sp, вперше виділеному в Данії [10]. Порівняння послідовності нуклеотидів ізоляту "Карпати" з нуклеотидними послідовностями з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (NCBI) показало, що ампліфіковані фрагменти кДНК на 95-99% ідентичні послідовностям генів NS і VP2 штаму Sp. Серед ізолятів штаму Sp найбільш спорідненими до українського ізоляту IPNV виявились віруси, виділені у Великобританії, Норвегії, Франції, Турції та Ірані (рис. 2.).



А



Б



В

Рис. 2. Філогенетичний аналіз гену NS (А) та N- (Б) і С-кінцевих (В) ділянок гену VP2 українського ізоляту IPNV “Карпати”. Древа будувалися за допомогою алгоритма Neighbor-joining у програмі MEGA версії 5.2. На рисунку 2А показано співвідношення всіх серотипів IPNV та приналежність українського ізоляту до штаму Sp. Рисунки 2Б та 2В демонструють взаємозв’язок ізолятів штаму Sp.

Таким чином ізолят, який був виділений з басейну річки Сирет в Чернівецькій області Західної України належить до штаму Sp. На

жаль в банку геномів NCBI ми не знайшли нуклеотидні послідовності ізолятів IPNV, виділених в країнах Східної Європи. Відповідно ми не змогли порівняти їх з нуклеотидними послідовностями українського ізоляту IPNV “Карпати”.

IPNV призводить до суттєвих економічних втрат при культивуванні лососевих видів риб у всьому світі. Спалахи захворювань, спричинених IPNV, відбуваються навіть в країнах з добре розвинутим лососевництвом і цей факт, скоріше за все пов’язаний з імпортом риби та її ікри. В таких умовах сучасної аквакультури необхідно провести моніторинг популяції райдужної форелі, яка культивується в рибогосподарських підприємствах басейна річки Сирет для того, щоб підтвердити наявність або відсутність там IPNV. Для цього необхідно використовувати методи молекулярної діагностики, такі як ПЛР. Крім діагностики даного патогена, метод ПЛР додатково дозволить визначити генотип ізолюваного штаму IPNV та його можливе походження.

Таким чином підібрані олігонуклеотидні праймери можуть бути використані для ідентифікації вірусу IPNV в природних водоймах і форелевих господарствах України. Для експрес-діагностики українського ізоляту IPNV краще за все використовувати праймери WB. Проведення всеукраїнського моніторингу IPNV дозволить скласти цілісну картину розповсюдження цього вірусу в країні, а також ідентифікувати інші штами, які циркулюють у Європі. Це буде предметом наших майбутніх досліджень.

Література

1. Proposal for a fourth aquabirnavirus serogroup / P.F. Dixon, G.-H. Ngoh, D.M. Stone [et al.] // *Archives of Virology*. – 2008. – Vol. 153. – P. 1937-1941.
2. Woo P.T.K. *Fish Diseases and Disorders. Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections* / P.T.K. Woo, D.W. Bruno. - CABI, 2011. - 944 p.
3. Rud Yu. *Detection of IPNV in the western Ukraine* / Yu. Rud, L.P. Buchatski // *AQUA 2012 (September 1- 5, 2012, Prague, Czech Republic): abstract book*. - Prague, 2012. - P. 166.
4. Antychowicz J. *The isolation of viral haemorrhagic septicaemia and infectious pancreatic necrosis viruses in trout in Poland* / J. Antychowicz, M. Wejman, E. Grawinski // *Med. Weter.* – 2000. – Vol. 56 (4). – P. 255-258.
5. *OIE Aquatic animal health code 12th Edition* // *World Organisation for Animal Health (www.oie.int)*. – 2009. – 288 p.
6. Wolf K. *Established eurythermic line of fish cells in vitro* / K. Wolf, M.C. Quimby // *Science (Washington DC)*. – 1962. – Vol. 135. – P. 1065.
7. Pryde A. *Nucleotide sequence analysis of the serotype-specific epitope of infectious pancreatic necrosis virus* / A. Pryde, W.T. Melvin, A.L.S. Munro // *Arch. Virol.* – 1993. – Vol. 129. – P. 287-293.

8. *Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay* / S.L. Blake, W.B. Schill, P.E. McAllister [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – Vol. 33 (4). – P. 835.

9. *Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses* / K. Williams, S. Blake, A. Sweeney [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1999, Vol. 37 (12). – P. 4139.

10. *Vestergaard-Jørgensen P.E. Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (Salmo gairdneri) in Denmark* / P.E. Vestergaard-Jørgensen, F. Bregnballe // *Nord. Vet.-Med.* – 1969. – Vol. 22.

Резюме

Рудь Ю.П., Майстренко М.І., Бучацький Л.П. Ампліфікація та аналіз нуклеотидної послідовності генів VP2 та NS вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, виділеного в Західній Україні.

Розроблено метод експрес діагностики українського ізоляту "Карпати" вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) на основі методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Підбрано олігонуклеотидні праймери, специфічні до фрагментів генів VP2 та NS, та проведено оптимізацію постановки ПЛР. Аналіз нуклеотидних послідовностей ампліфікованих фрагментів IPNV "Карпати" свідчить, що український ізолят належить до штаму Sp. Ампліфіковані фрагменти кДНК на 95-99% ідентичні з послідовностями генів NS та VP2 інших ізолятів штаму Sp. Серед ізолятів штаму Sp найбільш спорідненими до українського ізоляту IPNV виявились віруси, виділені у Великобританії, Норвегії, Франції, Турції та Ірані.

Ключові слова: вірус інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV), Західна Україна.

Резюме

Рудь Ю.П., Майстренко М.І., Бучацький Л.П. Ампліфікация и анализ нуклеотидной последовательности генов VP2 та NS вируса инфекционного панкреатического некроза, выделенного в Западной Украине.

Разработан метод экспресс диагностики украинского изолята "Карпаты" вируса инфекционного панкреатического некроза (IPNV) на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Подобраны олигонуклеотидные праймеры, специфические к фрагментам генов VP2 и NS, и проведена оптимизация постановки ПЦР. Анализ последовательностей нуклеотидов амплифицированных фрагментов IPNV "Карпаты" свидетельствует, что украинский изолят принадлежит к штамму Sp. Амплифицированные фрагменты кДНК на 95-99% идентичны последовательностям генов NS и VP2 других изолятов штамма Sp. Среди изолятов штамма Sp наиболее родственными к украинскому изоляту IPNV оказались вирусы, выделенные в Великобритании, Норвегии, Франции, Турции и Иране.

Ключевые слова: вирус инфекционного панкреатического некроза (IPNV), Западная Украина.

Summary

Rud Yu., Maistrenko M., Buchatsky L. Amplification and analysis of the nucleotide sequences of the genes NS and VP2 of infectious pancreatic necrosis virus isolated in Western Ukraine.

The method of polymerase chain reaction for Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), isolated in Western Ukraine, was developed. Three sets of primers targeting NS and VP2 genes were used for virus identification and the parameters of PCR were optimized. It was shown that WB primers are the most efficient for virus diagnostic. The nucleotide sequences of amplified fragments were analysed and the prevalence of Ukrainian isolate of IPNV "Karpaty" to Sp strain was revealed.

Key words: infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), Western Ukraine.

Рецензент: д.біол.н., проф. В.К. Рибальченко

ЕКОЛОГІЧНА І КЛІНІЧНА ІМУНОЛОГІЯ ТА ІМУНОРЕАБІЛІТАЦІЯ