

**МОРГУН<sup>2</sup> Б.В., ЛЕВЧУК<sup>1</sup> О.Б., РУМЯНЦЕВА<sup>3</sup> А.Є., ЮЗВЕНКО<sup>1</sup> Л.В.,  
ЛОЗОВА<sup>1</sup> О.Й., ДІДЕНКО<sup>1</sup> Л.Ф., КУЧУК<sup>2</sup> М.В., СПІВАК<sup>1</sup> М.Я.**

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України  
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 154

<sup>2</sup>Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України  
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148,  
e-mail: btorgun@gmail.com

<sup>3</sup>Національний технічний університет України “КПІ”, Факультет біотехнології  
і біотехніки України, 03056, м. Київ, проспект Перемоги, 37

## **КЛОНУВАННЯ ТА АНАЛІЗ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНОМНОЇ РНК ВІРУСУ ОПІКУ ГРЕЧКИ**

Вірус опіку гречки (ВОГ) був відкритий на гречаних полях біля міста Кам'янець-Подільська. Симптоматично захворювання викликає некротичні плями на листі гречки і призводить до втрат 80% врожаю [1].

За морфологічними ознаками, білковим, ліпідним та вуглеводним складом ВОГ можна віднести до родини Rhabdoviridae. Родина рабдовірусів включає в себе велику кількість вірусів, які вражають широке коло рослин, тварин та комах. Для цих вірусів характерна бациловидна форма, біліпідна та глікопротеїнова оболонка, наявність 5 білків та мінус РНК, що складає геном [6].

Надзвичайно цікавим та актуальним є визначення послідовності геномної нуклеїнової кислоти нового вірусу для більш точної його класифікації та розробки дієвих заходів боротьби із захворюванням.

### **Матеріали і методи**

Вірус виділяли з листя інфікованих рослин *Nicotiana rustica* за допомогою ультрацентрифугування [2]. Вірусну геномну РНК отримували методом фенольно-хлороформної депротеїнізації [3]. Проводили ДНК-зну обробку (Dvase I, Fermentas) із застосуванням інгібіторів РНКаз (RiboLock™ RNase Inhibitor, Fermentas).

За допомогою Генетичного банку (GenBank®, NCBI) та програми ClustalW (<http://www.clustal.org/>) були підібрані праймери. При цьому порівнювались геноми фіторабовірусів, які є найкраще вивченими на сьогоднішній день — 4 нуклеорабовіруси (вірус жовтої сітчатості осоту (L32603), вірус тонкої смугастості кукурудзи (AY618417), вірус жовтої затримки росту рису (AB011257), вірус мозаїки кукурудзи (AY618418)) та 3 циторабовіруси (вірус північної мозаїки злаків (AB030277), вірус зморшкватості суниці (AY005146), вірус некротичного пожовтіння салату-латуку (AJ867584)).

Порівняння найбільш консервативних нуклеотидних послідовностей мотивів А, В, С та D домену III РНК-залежної РНК-полімерази вказаних вірусів дало змогу скомпонувати 5 праймерів. Вони обиралися на ділянках починаючи з 2000 по 11600 нуклетидів на геномах фіторабовірусів. Довжина перших чотирьох праймерів складала 26 нуклеотидів, з них 20 нуклеотидів на 5'-кінці були однаковими для всіх праймерів, тільки п'ятий (pr18)

складався з цієї універсальної частини, тобто містив 20 чітко визначених нуклеотидів [7]. Праймери мали наступні послідовності нуклеотидів:

pr14 — for 5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTCNCAÿCC-3' (ділянка геному 9113-9130),

pr15 — for 5'-GCCGGGCTCTGCAGAATTCBATGAG-3' (ділянка геному 9996-10013),

pr16 — rev 5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTCCKGTÿTC-3' (ділянка геному 10478-10493),

pr17 — rev 5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTCBYÿCCA-3' (ділянка геному 11576-11593),

pr18 — for/rev 5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTC-3'

Для зворотної транскрипції геномної вірусної РНК у кДНК використовувався набір oneStep RT-PCR Kit (Qiagen), що містив ферменти, які добре взаємодіють з вірусними РНК. Так як вірусна геномна РНК утворює стабільні термодинамічні конформації, які заважають проходженні реакції, то у наборі використовуються дві реверс-транскриптази (omniscrypt та sensiscrypt). Для однієї реакції ми використовували 2 мкг очищеного препарату РНК ВОГ з праймерами pr14-17. Наступна ампліфікація проводилася з праймером pr18 та 2 мкл кДНК матриці. Результати аналізувалися електрофорезом у агарозному гелі та ТВЕ буфері з бромистим етідієм.

Фрагменти ДНК очищалися від реакційних продуктів за допомогою Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas).

Клонування проводили набором InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) в основу якого покладено бактеріальний вектор pTZ57R/T. Лігазну суміш трансформували у *Escherichia coli* штам XL-1 Blue (Stratagene). Селекцію рекомбінантних клонів проводили на агаризованому селективному середовищі M001 (HiMedia) з додаванням 100 мг/мл карбініциліну.

Секвенування здійснювали у відділі біосинтезу нуклеїнових кислот Інституту молекулярної біології і генетики НАН України використовуючи форвардний праймер M13/pUC (-46) на капілярному секвенаторі Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems).

Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей проводили засобами Nucleotide BLAST, у той час як амінокислотних послідовностей — BLASTX на серверах Національного центру біотехнологічної інформації США (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### **Результати і обговорення**

Для проведення подальшої ідентифікації РНК вірусу спочатку потрібно було перевести геномну РНК у кДНК. При цьому використовувався набір для реверс-транскрипції та ПЛР oneStep RT-PCR kit (Qiagen), що містив ферменти, які добре взаємодіють з вірусними РНК. Часто РНК утворює різні шпильки, які заважають при реакції реверс-транскрипції. Вище згаданий набір містить дві реверс транскриптази (omniscrypt та sensiscrypt), що забезпечують ефективну реакцію навіть при малій концентрації РНК (від 1 рг до 2 мкг). Для ПЛР у oneStep RT-PCR наборі в якості полімерази було запро-

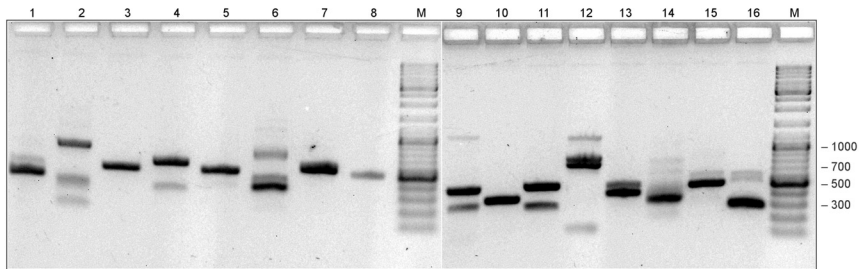


Рис. 1. Результати електрофорезу продуктів ампліфікації у різних комбінаціях праймерів. У якості маркера молекулярної ваги використовували O<sup>o</sup>GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas). Розмір вказано у парах нуклеотидів

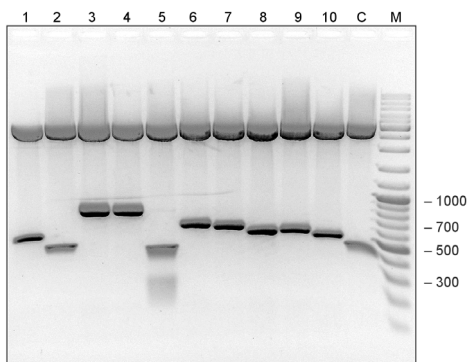


Рис. 2. Гель електрофореуз відібраних клонів ВОГ гідролізованих рестриктазою EcoRI перед секвенуванням. Доріжка 1-10, клони 8, 14, 30, 47, 51, 58, 62, 71, 75, 83 відповідно; доріжка 11, контроль; доріжка 12, маркер молекулярної ваги O<sup>o</sup>Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) у парах нуклеотидів

поновано HotStar Taq полімераза. Після проведення ПЛР з 4 праймерами в різних комбінаціях за допомогою oneStep RT-PCR kit (Qiagen) та наступного 1,2% агарозного гелю електрофорезу чітких дискретних фрагментів виявлено не було.

Проведений ре-ПЛР з праймером pr18, для того що б розмножити знайдені фрагменти. Ми отримали біля 20 фрагментів з різною молекулярною вагою, яка становила близько від 400 до 1000 пар нуклеотидів. З них 10 фрагментів було відібрано для клонування та більш детальнього аналізу (рис. 1).

Відповідно було відібрано 10 клонів (рВОГ:8; 14; 30; 47; 51; 58; 62; 71; 75; 83) з яких виділяли плазмиди. Наявність вставок була підтверджена гідролізом ендонуклеазою EcoRI. На рис. 2 зображено продукти рестрикції. Розміри вставок співпадають із розмірами ампліконів.

Порівняння секвенованих вставок з послідовностями генетичного банку показало невелику ідентичність до вірусів родини рабдовирусів (5–10%).

**Результати порівняльного аналізу амінокислотних послідовностей. Ідентичність та подібність вказано у відношенні кількості до загальної протяжності амінокислотних залишків та у відсотках**

Клон (вставка, п.н.)	Подібність	Ідентичність, кількість (%)	Подібність, кількість (%)
рВОГ.47 (512)	L білок [Мобала вірус], РНК-залежна РНК полімераза; Полімераза [Ласса вірус] Полімераза [вірус плямистості орхідеї]	22/86 (25%) 17/67 (25%) 12/33 (36%)	38/86 (44%) 29/67 (43%) 16/33 (48%)
рВОГ.51 (516)	ДНК-залежна РНК полімераза II subunit RPB1 homolog, [Aedes taeniorhynchus iridescent virus] Нуклеокапсидний білок [вірус жовтої сітчастості осоту]	13/28 (46%) 16/45 (35%)	19/28 (67%) 21/45 (46%)
рВОГ.62 (571)	РНК-залежна РНК-полімераза [вірус тонкої смугастості кукурудзи]	14/43 (32%)	24/43 (55%)
рВОГ.71 (525)	Глікопротеїн [вірус сказу] Глікопротеїн оболонки gp350 [людський герпесвірус 4]	13/37 (35%) 35/101 (34%)	19/37 (51%) 43/101 (42%)
рВОГ.83 (485)	Капсидний білок [Вірус хлорозу жилок Таро]	21/81 (25%)	34/81 (41%)

При аналізі даних літератури було виявлено, що рабдовіруси мають не високу спорідненість між собою. Наприклад, спорідненість геному вірусу плямистості орхідеї 20–30% між рабдовірусами рослин, 22–26% до рабдовірусів, які вражають тварин та вірусами інших родин (*Paramixoviridae*, *Bornaviridae*, *Filoviridae*) [4].

Аналіз амінокислотних послідовностей секвенованих фрагментів виявив більшу спорідненість до вірусів. Аналогічні спостереження відмічали у своїх роботах дослідники Кондо та Борисенко зі співавторами [4, 5]. Клон рВОГ.47 та рВОГ.62 мають найвищу подібність до РНК-полімерази рабдовірусів (32–36%). Крім того, спостерігалась подібність до РНК-залежної РНК полімерази мобала та ласса вірусів (25%), яка характерна для вірусів з мінус геномною РНК. Для клонів рВОГ.51, рВОГ.71, рВОГ.83 відмічалась подібність до глікопротеїну та нуклеокапсидного білку різних рабдовірусів (табл.). Покриття подібних ділянок становило близько 60%.

Для подальшого дослідження геномної РНК вірусу опіку гречки планується застосовувати гібридизацію, яка дасть змогу аналізувати більшу кількість клонів.

### **Висновки**

Виділено геномну РНК вірусу опіку гречки та проведено її зворотню транскрипцію. Підібрано вироджені праймери для ампліфікації консерва-

тивних ділянок РНК-залежної РНК-полімерази рабдовирусів рослин. Виділено та клоновано послідовності геномної РНК вірусу опіку гречки. Порівняння нуклеотидних послідовностей секвенованих вставок з послідовностями генетичного банку показало ідентичність до рабдовирусів (10%). Однак аналіз амінокислотних послідовностей секвенованих фрагментів виявив більшу подібність до глікопротеїну та нуклеокапсидних білків різних рабдовирусів. Покриття подібних ділянок становило близько 60%.

### Література

1. Шевчук В.К., Довгань С.В., Діденко Л.Ф., Демченко О.А., Юзвенко Л.В., Серденко О.Б., Снівак М.Я. Вірусний опік гречки в Україні // Карантин і захист рослин.— 2008.— №1.— С. 13–15.
2. Діденко Л.Ф., Пархоменко Н.И., Максименко Л.А., Дяченко Н.С., Зарицький Н.М., Варбанець Л.Д., Броварская О.С. Некоторые свойства структурных компонентов фиторабдовируса курчавой карликовости картофеля // Биополимеры и клетка.— 2001.— №4.— С. 308–313.
3. Steele, K.P., Frist, R.H. Characterization of the 32 Termini of the RNAs of Cowpea Mosaic Virus // J. Virol.— 1978.— 26.— №2.— P. 243–248.
4. Kondo H., Maeda T., Shirako Y., Tamada T. Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome // Journal of General Virology.— 2006.— Vol.87.— №8.— P. 2413–2421.
5. Borysenko L., Stepanets V., Rynditch A.V. Molecular characterization of full-length MLV-related endogenous retrovirus ChiRV1 from the chicken, *Gallus gallus* // Virology.— 2008.— Vol.376.— №1.— P. 199–204.
6. Kuzmin I.V., Novella I.S., Dietzgen R.G., Padhi A., Rupprecht C.E. The rhabdoviruses: Biodiversity, phylogenetics, and evolution // Infection, Genetics and Evolution.— 2009.— Vol.9.— №4.— P. 541–553.
7. Veliceasa D., Enunlu N., Kos P.B., Koster S., Beuther E., Morgun B., Sachin D. Deshmukh S.D., Lukacs N. Searching for a new putative cryptic virus in *Pinus sylvestris* L. // Virus Genes.— 2006.— Vol.32.— №2.— P. 177–186.

### Резюме

Було проведено клонування послідовностей геномної РНК вірусу опіку гречки. Аналіз амінокислотних послідовностей секвенованих фрагментів показав, що клоны рВОГ.47 і рВОГ.62 мали найвищу гомологію к РНК-полімеразі рабдовирусів (32–36%), а для клонів рВОГ.51, рВОГ.71, рВОГ.83 відзначалась гомологія к глікопротеїну та нуклеокапсидним білкам рабдовирусів. Покриття соответствующих участков составляло около 60%.

Було проведено клонування послідовностей геномної РНК вірусу опіку гречки. Аналіз амінокислотних послідовностей секвенованих фрагментів показав, що клоны рВОГ.47 та рВОГ.62 мали найвищу подібність до РНК-полімерази рабдовирусів (32–36%), а для клонів рВОГ.51, рВОГ.71, рВОГ.83 відмічалась подібність до глікопротеїну та нуклеокапсидним білкам рабдовирусів. Покриття подібних ділянок становило близько 60%.

Genomic RNA sequences of virus burn of buckwheat have been cloned. Amino acid sequence analysis of studied fragments showed the highest identity to rhabdoviral RNA-polymerase (32–36%) for clones pVBB.47 and pVBB.62, while for clones pVBB.51, pVBB.71, pVBB.83 the similarity to rhabdoviral glycoprotein and nucleocapsid proteins was noticed. The coverage of homologous regions made out approximately 60%.

**ПІДПАЛА О.В., ЯЦИШИНА А.П., ЛУКАШ Л.Л.**

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,  
Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 150; e-mail: pidpala@ukr.net*

## **ПОГЛЯД НА ЕВОЛЮЦІЮ *HOMINOIDEA* НА ОСНОВІ РОЗПОДІЛУ IS-ФРАГМЕНТІВ У мтДНК**

Гоміноїди (*Hominoidea*, *Anthropomorpha*) — надродина вузьконосих мавп, до яких належать людиноподібні мавпи (гібони, орангутанги, горили, шимпанзе) і людина [1]. Визначено час дивергенції основних її гілок: близько 40 млн років тому гоміноїди відділились від *Cercopithecoidea* (собакоголових); одна із її гілок близько 30 млн років тому дала початок гомінідам; 20 млн років тому відділилась гілка гібонів; 16–13 млн. років тому — гілка орангутангів; 10 млн років тому — гілка горил; близько 7 млн років тому від предків сучасних шимпанзе відділилась гілка гомінін, яка трансформувалась у кілька видів людей [2–4]. Класифікація гоміноїдів не є усталеною. Час від часу вона зазнає змін і уточнень. Для вивчення філогенії та систематики широко використовують молекулярні маркери і серед них мітохондріальні ДНК (мтДНК) [5, 6] та мобільні генетичні елементи (МГЕ) [7, 8]. МГЕ, які індукують множинні мутації у ядерному геномі, у мітохондріях тварин, зокрема і у людини, не виявлені. Наявність фрагментів ретротранспозонів у мт-геномі описано у рослин (*Arabidopsis thaliana*) [9]. У мтДНК людини нами у попередній роботі ідентифіковано фрагменти МГЕ еукаріот і бактеріальних IS-елементів [10]. Метою даної роботи було з'ясувати, чи присутні вони у мтДНК інших гоміноїдів і чи можуть бути вони інформативними для філогенетичних досліджень.

### **Матеріали і методи**

Проаналізовано 13 мтДНК 9 видів гоміноїдів, які належать до двох родин. Перелік видів і номери послідовностей мтДНК у GenBank наведено у табл. 1. Для пошуку та ідентифікації фрагментів МГЕ еукаріот використовували програму Censor (<http://www.girinst.org/censor>) [11], а для фрагментів бактеріальних IS-елементів користувались базою даних ISfinder (<http://www.is.biotoul.fr>) [12].

### **Результати та обговорення**

В усіх мтДНК досліджуваних видів гоміноїдів виявлено фрагменти МГЕ еукаріот і бактеріальних IS-елементів (IS-фрагменти). Їхня частота становить 0,84–3,32% і 1,03–1,89%, відповідно. Стосовно фрагментів МГЕ еукаріот спостерігали велику гетерогенність. Для того, щоб простежити закономірність, пішли від зворотнього — прослідкували наявність специфічних для людини фрагментів у інших гоміноїдів (табл. 2). Виявили, що є фрагменти, які специфічні винятково для *Homininae* (горили, шимпанзе, людина), є специфічні для *Hominini* (шимпанзе, людина) і специфічні тільки для *Pongo sapiens*. Несподіваним було виявлення гомологічних фрагментів у *Pongo abeli* і *Homo* та у горил і людини (гаплотип L2). Гіпотетично це може свідчити про еволюційну близькість або про можливість схрещувань предкових (пере-