



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



МЕТАГЕНОМНЫЙ АЛГОРИТМ СОЗДАНИЯ ДИАГНОСТИКУМОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ ПЧЕЛ

Калашников А.Е.¹, Бурмистрова Л.А.², Бородачев В.И.², Масленникова В.И.³, Королев А.В.³, Гладырь Е.А.¹

¹ФГБУН Всероссийский институт животноводства имени Академика Л.К. Эрнста,
г. Дубровицы, Московской области, 142132

²ФГБУН Институт пчеловодства, г. Рыбное, Рязанской области, 391110

³ФГБОУ ВПО Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии им. К. И. Скрябина, г. Москва, 109472 E-Mail: aekalashnikov@yandex.com

АННОТАЦИЯ

Применение биоинформационных технологий и технологий анализа необходимо для создания диагностикумов нового поколения. Создание таких тестов требует как нового подхода к расчетам селективной части, так и подбору реагентов. Представленный пример позволяет пойти более эффективным путем при выявлении ретровирусов и анализа их геномов. Применение диагностикума на практике выявило высокую степень инфицированности племенных и частных пасек в Рязанской области.

Ключевые слова: ретровирусы, метагеномика, вариабельность вирусов, *Apis mellifera*, кинетика мутаций, диагностика.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно развиваются информационные технологии, которые позволяют решать ряд важных задач в области генетики. Среди поставленных перед этой областью науки задач является анализ гомологии известных нуклеотидных и белковых последовательностей, выявление статичных и областей высокой кинетики мутаций, а также проведение термодинамического и факторного анализа, позволяющего в автоматическом режиме подбирать специфические олигонуклеотиды и флуоресцентные зонды к определенным областям генома РНК-содержащих вирусов.

Выбранная модель исследования представляет вирусы пчел KBV (*Kashmir bee virus*, Кашмирский вирус), ABPV (*Acute bee paralysis virus*, вирус острого паралича), CBPV (*Chronic bee paralysis virus*, вирус хронического паралича), DWV (*Deformed bee virus*, вирус деформации крыла), SBV (*Sacbrood bee virus*, вирус мешотчатого расплода), IAPV (*Israel acute paralysis virus*, вирус Израильского паралича), BQCV (*Black queen cell virus*, вирус черных маточников), SPV (*Slow paralysis virus*, вирус медленного паралича), заболевание которыми вызывают высоко контагиозную инфекцию, которая протекает в скрытой форме, поражая пчелиные

семьи [Begeny *et al*, 2006, DeMiranda 2010].

Для эффективной борьбы с инфекцией необходимо разрабатывать современные методы диагностики. Диагностика классическими методами: РИД, ИФА - не может обеспечить достаточной диагностической и аналитической чувствительности [Зиновьева и др., 2010].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена на базе лаборатории молекулярной генетики животных ВИЖ на образцах 10 семей (N=30 особей взрослых пчел инфицированных пасек с клещевым поражением Рязанской области). Проведен масштабный метагеномный поиск и анализ нуклеотидных последовательностей вирусов (N>650 НП, внесенных в базу GenBank) было осуществлено в программе Ugene 1.11.3, с использованием алгоритмов ClustalX и Muscle (данные не показаны, и доступны по [https://sites.google.com/site/aekalashnikoff/genomics-in-virology-alexander-kalashnikov/list-of-publications-alexander-kalashnikov, и https://www.researchgate.net/profile/Alexander_Kalashnikov]. Отличие метода было в том, что нуклеотидные последовательности фильтровали согласно максимального различия по географическому

происхождению изолятов, а также по максимальной генетической подразделенности.

Для каждого вируса определены несколько областей с низкой степенью кинетики мутаций, для которых был осуществлен дизайн праймеров с

использованием алгоритма Primer 3]. Образование вторичных структур и димеров проверяли при помощи *UnaFold* (табл. 1). *BLAST*(очки) рассчитывали по формуле:

$$BSc = \frac{freq_{TargetPrimer 1} + freq_{TargetPrimer 2}}{N_{tax viuses}} + freq_{PRIMERBLAST} + Ufold + Tm$$

где *freq*(N) - количество совпадений без замен, *tax*-суммарное количество последовательностей в таксоне, *Ufold*- совпадение *Ufold* (очки 0/1), *PRIMER-BLAST* - количество совпадений без замен в *PRIMERBLAST*, разделенное на общее количество совпадений.

Выделение ДНК из взрослых пчел осуществляли индивидуально при помощи набора ДНК сорб В (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), реакцию обратной транскрипции при помощи набора MMLV RT kit (Евроген, Россия) с количеством фермента 50 ед/реакция. Амплификацию при помощи qPCRMix-HS SYBR (Евроген, Россия) (New England Biolabs, Англия, [Maskay, 2002]) осуществляли по алгоритму, рекомендованному производителем с временем отжига праймеров и элонгации 30 и 45 сек соответственно (40 циклов). Концентрация праймеров для амплификации референсного гена составляла 100 пмоль, а целевых генов 200 пмоль. Детекцию флуоресценции SYBR осуществляли по 1 каналу CFX (Bio-Rad, США) при температуре, начинающейся с температуры плавления специфического продукта. Среднее значение относительного количества РНК вируса и встроенной провирусной РНК рассчитывали по руководству Bio-Rad [Livak, Schmittgen, 2001]. Концентрацию РНК и ДНК измеряли в кварцевой кювете на спектрофотометре Amersham Bioscience (Швеция) (табл. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Специфичность всех вариантов олигонуклеотидов проверена по системе подсчета очков совпадений в системе *BLAST*. Для синтеза и сборки ПЦР выбраны лучшие из представленных 35-ти вариантов и созданы соответствующие тесты в количественной системе детекции SYBR относительно референсного гена ActB (β -актина) (оптимизированные по количеству праймеров и температуре их отжига). Амплификацию осуществляли для мишеней как провирусной ДНК, так и активной формы РНК вирусов (после проведения стадии обратной транскрипции). Детекцию флуоресценции осуществляли начиная с температуры образования продукта расчетной температуры плавления (табл. 1). Аналитическая чувствительность тестов составляла разведение до 1024 раз (конечная концентрация 0.07 мкг/мкл). Измеренная концентрация образцов ДНК после выделения представляла 196-1544, а РНК 38-1344 мкг/мл. В дальнейшем образцы нормализованы до

концентрации 50 мкг/мл. Специфичность праймеров была проверена по кривым плавления целевого продукта и по результатам электрофореза ампликата в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием (данные не показаны).

Тесты оказались эффективнее разработанных ранее для выявления вирусов пчел *COLOSS* [www.coloss.org], которые выявляли от 20-85% положительных особей [Bereney et al, 2006, Калашников и др., 2010; 2014]. Средняя частота встречаемости провирусной ДНК и РНК DWV составила не менее 75%, а CBPV более 80%.

Распределение количества в различных семьях пчел было отличным и различалось для образцов провирусной ДНК и РНК в достаточно широком диапазоне (табл. 3). Степень встраивания РНК вируса в геномную ДНК хозяина составляет соотношение с геномной ДНК 10⁻³-10⁻⁵ и минимально, по сравнению с концентрациями РНК в тканях пчелы тех же семей и отдельных особей. При этом поражение отдельных пчел в качестве носителей (а следовательно, считая их дальнейшими передатчиками инфекции) было очень высоким. Активная форма вируса выявлена в преобладающем числе пчелиных семей и с большей концентрацией.

Таким образом, в настоящем исследовании проверен новый универсальный способ реализации метагеномного анализа существующих последовательностей ретровирусов пчел в виде единой базы данных с выявлением областей низкой кинетики мутаций, по которым подобраны специфические праймеры для выявления соответствующих вирусов. Показана высокая эффективность созданных тестов, а также проведено модельное исследование нативных семей пчел на пасеках в России с количественным определением содержания вируса, которое было большим в случае выявления активной формы вируса.

Применение данного теста позволит эффективно выявлять не известные ранее подвиды вирусов, а также осуществлять мониторинг пасек в кратчайшие сроки с количественной детекцией.

Работа поддержана соглашением с РФФ

по проекту "Изучение, сохранение и рациональное использование биоразнообразия животных как основы получения здоровой, безопасной и высококачественной пищи" № 14-

36-00039. Авторы работ благодарят ЦКП ВИЖ им. Л.К. Эрнста за предоставленный технический парк оборудования и возможность проведения работ.

Таблица 1.

Последовательности праймеров и условия проведения ПЦР

№ п.п.	Вирус	Последовательность праймеров 5'-3' Прямой, обратный, длина амплификата, п.н.	T _a , °C	T _m , °C	BSc
1	ABPV	TCAACCAGGCTATAACCAAC	54.7	77.5	1.10
		TCTTGAAAATGCTTCACCAA, 157			
2	BQCV	CCGTTAGTCCTCAACAGACT	54.0	84.5	3.03
		AAACATGGAGCATAGTACGG, 130			
3	CBPV	ATTGTGAAGCCCAAAACCTG	56.8	72-85	1.50
		GAACCGCTTCGGTGGTAATA, 177			
4	KBV	GCAAATTGATGCTCCTAATG	56.8	82.0	1.11
		TCATAGTCTAATGGGGCAAG, 153			
5	DWV	ATATGCTTTTCCAGGTCCAT	55.0	80.4	1.18
		CTCGCTTCTTCTTCTCACTC, 204			
6	SBV	GGTGACCTTCATCCAGTATC	54.7	76.0	2.39
		GGGTTTCATTTTCGATAACC, 186			
7	IAPV	AGATGTAAGCATGCAGATCC	56.4	75.0	2.58
		CTGAGATCTTCAGGACCAAA, 105			
8	SPV	GTGGGCTGATAGGATGTTAC	56.4	75.0	4.00
		ATCAATGTTATGCGTGGAAG, 201			
9	ActB*	AGGAATGGAAGCTTGCGGTA	55-65 опт59	80.5	0.507
		AATTTTCATGGTGGATGGTGC, 182			

* [Chen et al, 2005]

Таблица 2.

Результаты определения средней встречаемости и количества РНК-содержащих вирусов

№ п.п.	Наименование вируса	Частота встречаемости вируса (семей N=10, образцов 30)	Среднее относительное количество вируса, R, p=0.05
<i>Провирусная ДНК</i>			
1	ABPV	0.2	3.98±2.01*10 ⁻³
2	BQCV	0.4	6.41±2.23*10 ⁻⁶
3	KBV	0.8	3.95±1.50*10 ⁻²
4	SBV	0.9	1.79±0.63*10 ⁻³
5	IAPV	0.8	3.02±1.23*10 ⁻⁵
6	SPV	0.9	3.41±1.68*10 ⁻⁴
<i>РНК (в виде кДНК, активная форма вируса)</i>			
7	ABPV	0.7	5.41±2.08*10 ⁻¹
8	BQCV	0.3	1.27±0.63
9	KBV	1.0	2.97±2.8*10 ⁻¹
10	SBV	0.9	3.27±1.88*10 ⁻²
11	IAPV	0.5	1.66±1.17*10 ⁻²
12	SPV	0.8	1.81±1.07*10 ⁻²
13	CBPV	0.8	1.14±0.689*10 ⁻²

Таблица 3.

Распределение встречаемости вирусов в выборке

Номер семьи	ДНК ABPV	РНК ABPV	ДНК BQCV	РНК BQCV	ДНК KBV	ДНК KBV
3	7.18E-07	1.36E+00	5.04E-07	3.30E+00	1.87E-02	2.52E+00
6	*	6.11E-02			9.92E-02	8.33E-03
7			2.36E-06		1.18E-02	1.60E-02
8	7.96E-03				1.12E-01	1.02E-02
9		3.26E-02			2.79E-03	1.90E-02

15					4.73E-02	4.49E-02
17				5.16E-01	2.29E-03	2.00E-01
18		4.54E-01				1.45E-01
19			1.42E-05	7.54E-06		2.23E-03
20		1.73E-01	0.00E+00		2.28E-02	6.00E-03
	ДНК SBV	РНК SBV	ДНК IAPV	РНК IAPV	ДНК SPV	РНК SPV
3	7.58E-06		1.54E-06			7.86E-02
6	1.37E-02	1.40E-04	4.57E-05		2.32E-03	1.12E-05
7		1.34E-02		1.98E-03	1.96E-04	
8	2.22E-03	1.01E-02	8.98E-05	3.48E-03	3.01E-04	6.94E-03
9	5.85E-05	3.04E-03	2.13E-06	2.42E-03	9.85E-05	1.82E-03
15	4.70E-05	1.09E-02	7.03E-05		3.94E-05	1.19E-03
17	1.74E-05	1.63E-01		7.48E-02	8.70E-06	3.77E-02
18	7.34E-05	5.59E-02	2.15E-05		5.17E-05	
19	7.40E-06	2.38E-04	8.27E-06	3.10E-04	2.74E-05	
20	1.69E-05	3.68E-02	2.51E-06		2.13E-05	2.14E-04

* нулевые значения в таблице не показаны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зиновьева Н.А., Костюнина О.В., Гладырь Е.А., Банникова А.Д., Харзинова В.Р., Ларионова П.В., Шавырина К.М., Эрнст Л.К. Роль ДНК-маркеров признаков продуктивности сельскохозяйственных животных // Зоотехния. 2010. №1. С. 8-10.
2. Калашников А.Е., Удина И.Г. Эпидемиологическое состояние некоторых пасек при инфицировании семей пчел РНК-содержащими вирусами // VetPharma. Pharm Animals, 2014(1). С. 80-84.
3. Удина И.Г., Кунижева С.С., Гришечкин А.Е., Калашников А.Е., Учаева В.С., Кривцов Н.И., Злобин В.И. Обнаружение вируса деформации крыла у медоносной пчелы *Apis mellifera* L. на пасеках в Московской области методом ОТ-ПЦР // Вопросы вирусологии, 2010(5). С. 37-40.
4. Berenyi O., Bakonyi N., Derakhshifar I., Koglberger

- H., Nowotny N. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries // Appl Envir Microbiology. 2006. V.72. N.4. P. 2414-2420.
5. Chen Y.P., Higgins J. A., Feldlaufer M.F. Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR Analysis of Deformed Wing Virus Infection in the Honeybee (*Apis mellifera* L.) // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V.71. N.1. P. 436-441.
6. DeMiranda J.R., Genersch E. Deformed wing virus // J Interebr Patology. 2010. V.103. N.1. P. 48-61.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR data // Methods. 2001. V.25. P. 402-408.
7. Mackay I.M., Real-time PCR in the microbiology laboratory // Clinical Microbiology and Infection. 2002. V.10. I.3. P. 190-212.

METAGENOMIC ALGORITHM FOR CREATING THE DIAGNOSTIC KITS FOR THE DETECTION OF RNA VIRUSES OF HONEY BEES

Kalashnikov A.E.¹, Burmistrova L.A.², Borodachev V.I.², Maslennikova V.I.³, Korolev A.V.³, Gladyr E.A.¹

¹Ernst All-russian Research Institute of Animal Husbandry, Dubrovitsy, Moscow region, 142132

²Institute of Beekeeping, Rybnoye. Ryazanskaya region, 391110

³K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, 109472,

E-Mail: aekalashnikov@yandex.com

ABSTRACT

Application of bio-information technology and analysis techniques is necessary for creation a new generation of diagnostics. Establishment of such tests requires a new approach to selective parts calculations and selection of reagents. Presented example allows you to be more effective on the way in identifying of retroviruses and analysis of their genomes. The use of this test in practice found a high degree of infection of tribal and private apiaries in the Ryazan region.

Keywords: retroviruses, metagenomics, virus variability, *Apis mellifera*, mutation kinetics, diagnostics.