

Изучение действия эндонуклеазы бактериальной на вирус мешотчатого расплода (SBV), поддерживаемого на клеточной линии Vero

Селедцова Г.В.¹, Кащенко Э.А.¹, Келин Л.В.², Рябова А.А.²

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

² ООО «Северный стиль», Москва

Вирус мешотчатого расплода (SBV) является одним из самых распространенных в мире и вызывает гибель личинок. Тем не менее, нет разработанных методик по выделению вируса из пчел, заражению клеточных линий и наработке вирусных частиц. В ходе работы изучено действие препарата Эндовираза[®] на SBV и определена профилактическая доза, что имеет важное практическое значение в пчеловодстве.

Ключевые слова: вирус мешотчатого расплода, клеточная линия Vero, Эндовираза, профилактический эффект.

The study on action of bacterial endonuclease on the Sacbrood virus (SBV), supported on the Vero cell line

Seledtsova G.V.¹, Kashchenko E.A.¹, Kelin L.V.², Ryabova A.A.²

¹Research Institut Fundamental and clinical immunology, Novosibirsk, Jadrintsevskay St 14

²Ltd «Northern style», Novosibirsk, Krasny Prospekt St 152

Sacbrood virus (SBV) is one of the most popular in the world and causes the death of the larvae. However, no techniques developed for virus isolation from bees, infection of cell lines and operating time of the viral particles. During the studied effect of the Endoviraza[®] on SBV and picked prophylactic dose that is of practical importance in beekeeping.

Keywords: Sacbrood virus, cell line of Vero, Endoviraza, preventive effect.

Введение

Определено и описано более 18 вирусов медоносных пчел (Allen, Ball, 1996). Среди них наиболее распространенным является вирус мешотчатого расплода (SBV), который вызывает гибель личинок.

Вирус мешотчатого расплода был первым вирусом, выделенным от насекомых. SBV является вирусом с одноцепочечной РНК (Lanzi et al., 2006; Mayo, 2002; Chang-Hee Kweon et al., 2015). Геном SBV включает в себя 8832 нуклеотида, кодирующих 2858 аминокислоты (Ghosh et al., 1999). По современной классификации он принадлежит к порядку Picornvirales, семейству Iflaviridae, роду Iflavirus (Christian et al., 2002).

Для ограничения распространения вируса используют противовирусные препараты, в частности, препарат Эндовираза[®] (производитель ООО «Северный стиль») на основе фермента эндонуклеаза бактериальная. Для изучения действия эндонуклеазы на SBV на базе НИИФКИ была разработана методика выделения вируса из пчел и заражения клеточной линии Vero. Данные методики можно применять для наработки вирусных частиц, разработки противовирусных препаратов.

Материалы и методы

Культивирование клеток

Линия клеток Vero получена в 1962 г. Y.Yasumure и Y.kawakita из почки взрослой африканской зеленой мартышки. В коллекцию культур клеток НИИФКИ линия клеток поступила в 2015 г. из коллекции ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». Клетки сохраняли пассированием *in vitro* в пластиковых флаконах объемом 150 см³ («Costar», США) в среде Игла MEM – 90%, содержащей 5 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин и антибиотики, а также 10% инактивированной фетальной сыворотки крупного рогатого скота («Biowest SAS», Франция) в атмосфере с 5% CO₂, при 37°C. Частота пассирования 4-7 суток. Посевная концентрация 75-100 тыс. клеток в 1 мл. Снятие клеток из культурального флакона осуществляли посредством 5-15 минутной экспозиции в растворе с 0,25 % трипсином и ЭДТА. После отмывки и подсчета клетки замораживали в 90% инактивированной фетальной сыворотки крупного рогатого скота с добавлением 10% ДМСО. Хранили при температуре – 80°C.

Получение вируса из ткани личинки пчелы.

Образец личинки, инфицированный вирусом мешотчатого расплода, аккуратно измельчали в натрий-фосфатном буфере (pH 7,4) с использованием стеклянного гомогенизатора. После растворения и гомогенизации личинки в буфере, раствор фильтровали через мембранный фильтр с порами 0,2 мкм (размер вируса 25-30 нм). Отфильтрованный образец разбавляли в 10 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Для дальнейшего использования образец был разлит на аликвоты и заморожен при температуре -18°C.

Определение жизнеспособности клеток

Определение жизнеспособности клеток проводилось по общепринятой методике с использованием в качестве красителя 1% раствор трипанового синего на изотоническом физиологическом растворе. При использовании трипанового синего окрашиваются только погибшие и с поврежденной мембраной клетки.

Подсчет клеток проводился в камере Горяева и вычислялся по следующей формуле:

$$X = K \times A \times 10^4, \text{ где}$$

K – разведение; A – количество клеток в 25 больших квадратах камеры.

Процент увеличения/уменьшения жизнеспособности клеток вычисляли по формуле:

$$O = K / K \times 100, \text{ где}$$

K – контроль; O – опыт.

Качественное определение вируса

Для выделения РНК из культуральной жидкости использовали набор GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) согласно инструкции производителя. С выделенной РНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием 6-ти буквенных случайных праймеров (ДНК-синтез, <http://www.oligos.ru/oligo.html>) и фермента обратная транскриптаза MoMLV (Биосан, http://biosan-nsk.ru/products/fermenti/obratnaya_transkriptaza/). Условия проведения

реакции: 20 мМ трисHCl, pH 8.3, 50 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотрейтол, 100 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфаты, 0,2 мкг РНК, 200 ед. обратной транскриптазы, 37°С 60 мин.

Полученную кДНК использовали в ПЦР-реакции с праймерами, специфичными для гена структурного полипротеина вируса мешотчатого расплода пчел (GenBank: AY626247.1, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/48527189?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=JP9ZWARH014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/48527189?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=JP9ZWARH014)): SB 2 s (5'-AGGAGTTТААСТААТСТГТТGGATGCCT-3') и SB 2 a (5'-TACACCTGCCGTAGCTGTTTTATGC-3'). Реакцию проводили с использованием набора «Taq ДНК полимеразы + буквы» (Евроген, <http://evrogen.ru/products/PCR-kits/Taq-pol.shtml>). Условия амплификации: 32 цикла (94°С 30 сек, 60°С 30 сек, 72°С 20 сек), за которыми следует стадия элонгации при 72°С 5 мин. В качестве матрицы добавляли продукт реакции обратной транскрипции (1/20 от объема ПЦР-реакционной смеси).

В качестве положительного контроля использовали продукт ПЦР-реакции с этими же праймерами и личинкой медоносной пчелы, зараженной вирусом мешотчатого расплода.

ПЦР-продукты анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле после окрашивания бромистым этидием. Для оценки длины полученных фрагментов использовали «ДНК-маркеры 100 bp + 1.5 Kb» от СибЭнзим (<http://russia.sibenzyme.com/info237.php>).

Определение влияния минимально и максимально допустимой концентрации препарата Эндовираза[®], на жизнеспособность клеток линии Vero.

Лиофилизат препарата Эндовираза[®] предварительно разводили в 10 мл 0,9 % растворе хлорида натрия. Культивирование клеток в количестве 2x10⁵/лунку проводили в плоскодонных 24-луночных планшетах (Linbro) в течение 4 суток, с добавлением препарата Эндовираза, активированного магнием сернокислым. Магний сернокислый растворяли в 500 мл 0,9%

раствора хлорида натрия. На поверхность клеточной линии наносили 1 каплю на 1 см² поверхности.

Определение профилактической эффективности препарата Эндовираза[®], с целью установления минимально допустимой концентрации препарата при заражении вирусом мешотчатого расплода.

К опытному образцу клеток линии Vero добавляли вирус мешотчатого расплода с одновременным внесением в культуру раствора препарата Эндовираза[®]. Определяли защитную дозу препарата, при которой не начинается заражение клеток вирусом мешотчатого расплода.

Результаты и обсуждение.

Первый этап работы - заражение клеточной линии Vero вирусом SBV получение супернатанта с содержанием вируса.

Для получения супернатанта с содержанием вируса проводили заражение клеток Vero вирусом мешотчатого расплода, содержащимся в ткани пчелы. Клетки линии Vero помещали в пластиковые флаконы («Costar», США) и добавляли образец вируса, после чего культивировали в течение 5-6 суток в количестве 10x10⁶ в 100 мл полной среды. После инкубации супернатант отфильтровывали от клеток, разливали на аликвоты и замораживали при температуре -18°C.

После инкубирования в течение 6 суток процент жизнеспособности клеток линии Vero, зараженной вирусом SBV из ткани пчелы, изменялся в сторону уменьшения (таблица 1).

Таблица 1 - Изменение жизнеспособности клеток линии Vero, зараженной вирусом SBV из ткани пчелы

Титр	1/5	1/10	1/100	1/ 1000
Жизнеспособность клеток (относительно контроля), %	-44	-16	-11	-11

После 6 суток инкубирования наблюдается уменьшение процента жизнеспособных клеток, особенно при разведении вируса 1/5. Таким

образом, в дальнейших исследованиях за инфекционную дозу (ИД50) принимают дозу вируса, вызывающую гибель у 50 % зараженных клеток, то есть вирус при разведении 1/5.

Для определения ИД50 дополнительно проводили культивирование клеток в количестве 2×10^5 /лунку в 24-луночных планшетах (Linbro) в течение 4 суток с добавлением супернатанта от клеточной линии Vero, содержащей вирус SBV (X единиц активности, X/2, X/4, X/6, X/8). За X единиц активности берут 1 мл супернатанта.

Для определения инфекционной дозы вируса вычисляли процент изменения жизнеспособности клеток линии Vero, зараженной вирусом SBV, относительно контроля (таблица 2).

Таблица 2 – Изменение жизнеспособности клеток линии Vero относительно контроля

Титр вируса	X	X/2	X/4	X/6	X/8
Жизнеспособность клеток линии Vero, %	58	25	3	3	8

При добавлении к клеткам линии Vero 100% супернатанта (X единиц активности) от клеточной линии Vero, содержащей вирус мешотчатого расплода, наблюдается снижение жизнеспособности в 4 раза и рост титра вирусных частиц (рисунок 2).

Качественное определение вируса проводили методом ПЦР (qRT-PCR).

Чтобы проверить, способен ли вирус мешотчатого расплода пчел амплифицироваться в культуре клеток Vero, было решено определять наличие вирусного генома в культуральной жидкости зараженных клеток. Данный вид вируса принадлежит к порядку пикорнавирусов и его геном представлен РНК. Поэтому перед проведением раунда полимеразной цепной реакции необходима стадия обратной транскрипции. Согласно нуклеотидной последовательности гена структурного полипротеина SBV, приведенной в

GenBank, размер продукта ПЦР-реакции со специфичными праймерами должен составлять 407 пар оснований.

ПЦР-анализ культуральной жидкости клеток Vero, инфицированных SBV, доказывает наличие в ней вирусных частиц, так как в агарозном геле визуализируется бэнд размером около 400 пар оснований, идентичный по длине ампликону, полученному в результате ПЦР-реакции положительного контроля (рисунок 1).

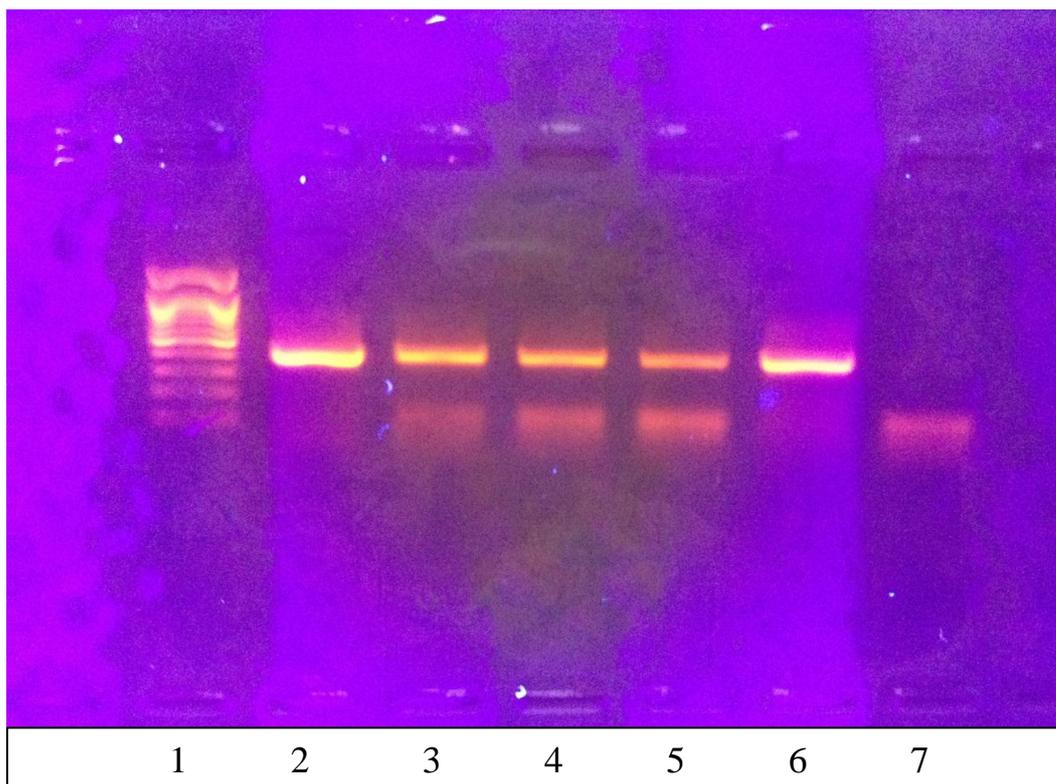


Рисунок 1 – Анализ ПЦР-продуктов методом электрофореза: 1 – маркер, супернатант клеточной линии Vero, зараженный SBV (6 сут); 2 – вирус 1:5; 3 – разведение в 10 раз; 4 – разведение в 100 раз; 5 – разведение в 1000 раз; 6 – положительный контроль; 7 – отрицательный контроль.

Вторым этапом работы было определение влияния максимально и минимально допустимой концентрации препарата Эндовираза[®] на жизнеспособность клеток линии Vero.

Препарат Эндовираза[®] содержит в качестве действующего вещества фермент эндонуклеазу бактериальную (дезоксирибонуклеат (рибонуклеат)

5'-нуклеотидгидролаза) 50 мг (активность 50000 единиц), а также вспомогательные вещества (декстран) 45 мг и магний сернокислый 0,62 г.

Эндонуклеаза бактериальная, продуцируемая бактериями *Serratia marcescens*, является внеклеточным ДНК/РНК неспецифическим ферментом.

Влияние препарата Эндовираза[®] в разных концентрациях на жизнеспособность клеточной линии Vero, зараженной SBV, оценивали относительно контроля (таблица 3, рисунок 2). В опытном варианте уменьшали титр концентрации препарата по пропорции Н, Н/2, Н/4, Н/6, Н/8, где Н=5000 единиц активности.

Таблица 3 – Изменение жизнеспособности клеток линии Vero относительно контроля после внесения препарата Эндовираза[®].

Титр препарата Эндовираза [®]	Н	Н/2	Н/4	Н/6	Н/8
Жизнеспособность клеточной линии Vero (%)	0	-16	10	33	41

Примечание. Н – 5000 единиц активности фермента.

Обобщая таблицу, можно сделать вывод, что 5000 единиц активности фермента (Н) является цитолитической дозой для клеток линии Vero. То есть 5000 единиц активности фермента является максимальной дозой для внесения в клеточную линию Vero. При уменьшении концентрации в 2, 4, 6 и 8 раз жизнеспособность клеточной линии достигает контрольных значений.

Третий этап работы - определение профилактической эффективности препарата Эндовираза[®].

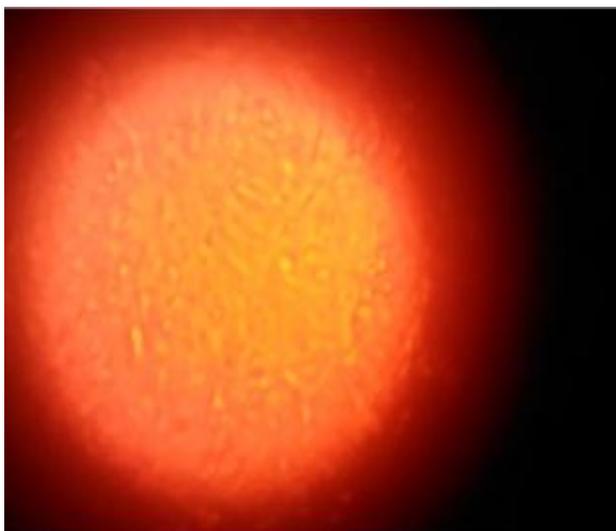
Для установления профилактической дозы Эндовиразы[®] на SBV была проведена обработка клеточной линии Vero разными концентрациями препарата (таблица 4).

К опытному образцу клеток линии Vero добавляли вирус мешотчатого расплода. Одновременно с этим вносили раствор препарата Эндовираза[®] в культуру. Уменьшали титр концентрации препарата по пропорции Н, Н/2, Н/4, Н/8, Н/16, где Н=5000 единиц активности.

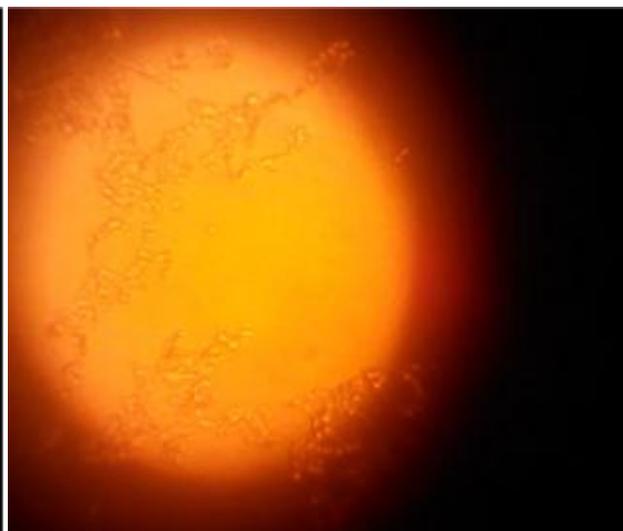
Таблица 4 – Профилактическое влияние Эндовиразы[®] на вирус мешотчатого расплода, поддерживаемого на клеточной линии Vero.

Разведение вируса (вирус/среда)	H	H/2	H/4	H/8	H/16
Жизнеспособность клеток линии Vero относительно контроля, %	-58	25	3	3	-8

Разведение H/16 или 312 единиц активности фермента является минимальной профилактической дозой препарата Эндовираза, при которой не начинается заражение вирусом мешотчатого расплода клеток линии Vero при культивировании в условиях *in vitro*. Оптимальной дозой является 2500 единиц активности фермента (разведение H/2).



Контроль (Vero)



Vero+эндовираза (5000 единиц активности)

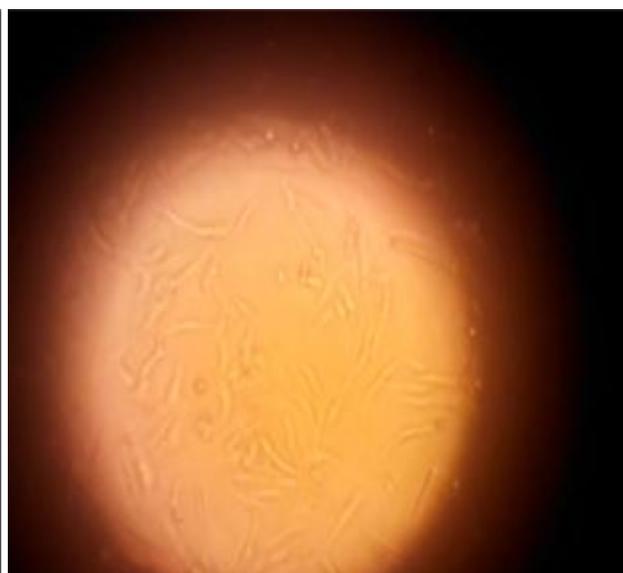
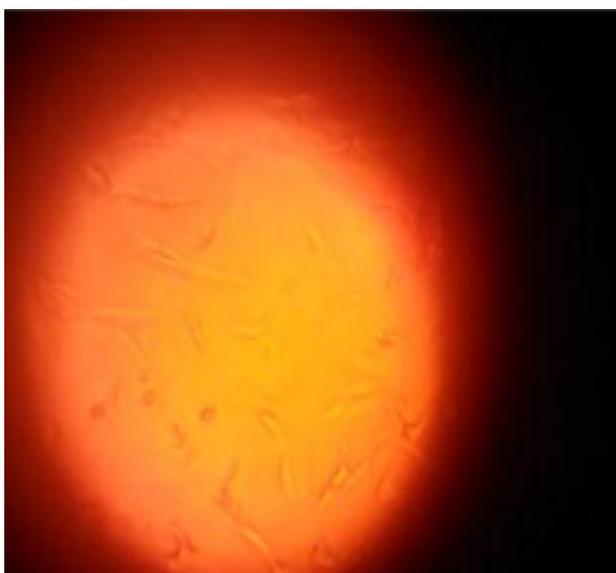


Рисунок 2 – Культура клеток Vero под световым микроскопом

Выводы.

В ходе работы были получены следующие результаты:

- доказано, что при заражении клеточной линии Vero репродукция вируса происходила в течение 6 суток инкубирования, при этом наблюдалось уменьшение процента жизнеспособных клеток, особенно при разведении вируса 1/5 (ИД50);

- доказана возможность репродукции вируса мешотчатого расплода после вторичного сбора вирусного материала, полученного из клеточной линии Vero; при добавлении к клеткам линии Vero 100% супернатанта от клеточной линии Vero, содержащей вирус мешотчатого расплода, наблюдается снижение жизнеспособности в 4 раза;

- ПЦР-анализ культуральной жидкости клеток Vero, инфицированных SBV, доказывает наличие в ней вирусных частиц; в агарозном геле визуализируется бэнд размером около 400 пар оснований, идентичный положительному контролю;

- определено, что 5000 единиц активности фермента является цитолитической дозой для клеток линии Vero и при уменьшении концентрации жизнеспособность клеточной линии достигает контрольных значений;

- доказано, что 312 единиц активности фермента является минимальной профилактической дозой препарата Эндовируса, при которой не начинается заражение вирусом мешотчатого расплода клеток линии Vero при культивировании в условиях *in vitro*; оптимальной дозой является 2500 единиц активности фермента.

В результате исследований были разработаны методики выделения вируса SBV из и заражения клеточной линии Vero. Получены доказательства

профилактического действия препарата Эндовираза® и определена оптимальная доза. Разработанная методика может применяться для разработки противовирусных препаратов для пчел.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Allen, M., Ball, B.V. The incidence and world distribution of the honey bee viruses. *Bee World*. – 1996. – 77. – P. 141-162.
2. Chang-Hee Kweon, Mi-Sun Yoo¹, Jin-Hyeong Noh, Kondreddy Eswar Reddy, Dong-Kun Yang, Sang-Ho Cha, Seung-Won Kang. Derivation of cell-adapted Sacbrood virus (SBV) from the native Korean honeybee. *Virus Research*. – 2015. – 198. – P.15–21.
3. Chen Y., Pettis J.S., Collins A.M., Feldlaufer M.F. Prevalence and transmission routes of honey bee viruses. *App. Environ Microbiol.* – 2006. – 72. – P. 606-611.
4. Christian, P., Carstens, E., Domier, L., Johnson, K., Nakashima, N., Scotti, P., van de Wilk, F., 2002. Dicistroviridae ICTVdb Index of Viruses. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_disis.htm
5. Lanzi, G., de Miranda, J.R., Boniotti, M.B., Cameron, C.E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S.M., Rosi, C. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Virol.* – 2006. - 80. – P.4998–5009.
6. Mayo, M.A. Virus taxonomy. *Arch. Virol.* - 2002. – 147. – P.1071–1076.
7. Ghosh, R.C., Ball, B.V., Willcocks, M.M., Carter, M.J. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. *J. Gen. Virol.* – 1999. – 80 (Pt. 6). – P.541–1549.

Сведения об авторах

Селедцова Галина Викторовна. Доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных биотехнологий, Федеральное государственное научное учреждение "Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии" (НИИФКИ), г. Новосибирск. Тел. 8(383)2282673, galina-seledtsova@yandex.ru

Кашенко Эрика Александровна. Кандидат биологических наук, научный сотрудник, Федеральное государственное научное учреждение "Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии" (НИИФКИ). Тел. 8(383)2002914, kaschenko.erika@yandex.ru

Келин Леонид Валерьевич. Кандидат экономических наук, директор
ООО «Северный стиль», г. Москва. Тел. 8(383)220-84-77, kelins@mail.ru

Рябова Анна Анатольевна. Кандидат биологических наук, технолог
ООО «Северный стиль». Тел. 8(913)7013556, annaryabova@ngs.ru