



УДК 619:578:616.98:578.828.11

А.П. ГЕРІЛОВИЧ, докт. вет. наук  
Б.Т. СТЕГНІЙ, докт. вет. наук, професор, академік НААН  
О.Ю. ЛИМАНСЬКА, докт. біол. наук  
С.К. ГОРБАТЕНКО, канд. вет. наук  
ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків

О.Й. ГРИНЕВИЧ, докт. мед. наук, професор  
І.Г. МАРКОВИЧ, канд. мед. наук  
І.В. ПОЛІЩУК, З.О. ЯЦУК, молодші наук. співробітники  
ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій», Київ

## ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА *pol* ВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

*Збудник лейкозу великої рогатої худоби як представник РНК-вмісних вірусів відзначається досить великою генетичною варіабельністю, що зумовлює значну інформативність філогенетичних досліджень його популяцій. Статтю присвячено характеристиці послідовностей гена *pol* вірусу лейкозу ВРХ завдовжки 440 п.н. із трьох господарств східного регіону України. Встановлено генетичну гомологію послідовностей характеризованих ізолятів із популяціями вірусів, які циркулюють на території Європи та європейської частини Російської Федерації.*

і консервативні фрагменти. До числа гіперваріабельних областей вірусного геному слід віднести гени *pol* та *tax*, які мають рівні дивергенції до 12–15%. Ці гени кодують неструктурні вірусні білки. Дослідження їх нуклеотидної структури дає уявлення про еволюцію збудника та його походження.

Раніше вже аналізували генетичну структуру українських ізолятів вірусу лейкозу (ВЛ) ВРХ щодо послідовностей гена *env*, який є класичною мішенню при генотипуванні збудника і молекулярно-епізоотологічних дослідженнях. Було показано європейське походження українських ізолятів вірусу лейкозу ВРХ.

Наведені матеріали характеризують дані філогенетичного аналізу ізолятів ВЛ ВРХ, які були детектовані в трьох неблагополучних щодо лейкозу ВРХ господарствах східного регіону України.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для досліджень за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та секвенування геному використовували зразки крові, стабілізованої 5% розчином цитрату натрію.

Зі зразків методом афінної сорбції було екстраговано сумарну ДНК, до складу якої входила також імовірна провірусна ДНК вірусу лейкозу ВРХ. Для екстракції сумарної ДНК, у т. ч. й провірусної ДНК вірусу лейкозу ВРХ, застосовано стандартну методику афінної сорбції в модифікації ННЦ «ТЕКВМ».

Для отримання мінливих фрагментів гена *pol* вірусу лейкозу ВРХ було ампліфіковано екстраговані зразки ДНК у ділянці завдовжки 440 п.н. При поста-

Відомо, що віруси, геном яких представлено РНК, характеризуються високою швидкістю варіювання нуклеотидної послідовності та пов'язаною з цим значною лабільністю структури генетичного матеріалу [2–4]. Геноми ретровірусів, подібно до інших РНК-вмісних вірусів, є високотваріабельними внаслідок мутацій, що виникають при копіюванні матриці в процесі реплікації, та можливих генетичних рекомбінацій.

Одним з представників ретровірусів є збудник лейкозу великої рогатої худоби (*Bovine enzootic leucosis virus*) – етіологічний агент лейкозу ВРХ. Вірус лейкозу ВРХ філогенетично пов'язаний з вірусами Т-клітинного лейкозу людини, HTLV-1 і HTLV-2, що пояснює наявність низки спільних ознак хвороб, зумовлених цими вірусами. Зокрема всі вони характеризуються необластичними процесами, а також супроводжуються імуносупресією й імунодефіцитними станами [1].

Геном збудника вміщує як варіабельні, так





новці ПЛР використано систему праймерів BLV3 розробки ННЦ «ІЕКВМ», що фланкує ділянку гена завдовжки 440 п.н., а також базові реагенти для постановки ПЛР виробництва компанії Fermentas (Латвія). Як позитивний контроль використовували ДНК, екстраговану з культури клітин нирки ембріона вівці (FLK), інфіковану вірусом лейкозу ВРХ.

Візуалізацію результатів ампліфікації здійснювали шляхом горизонтального електрофорезу в 1,5% агарозному гелі та фарбування бромистим етидієм. Специфічні монофрагменти були вирізані з гелю й екстраговані за допомогою Rapid Gel DNA extraction kit виробництва компанії Fermentas (Латвія).

Хімічне секвенування та ДНК-аналіз проведені на базі ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій» з використанням ампліфікаційного обладнання BioRad та ДНК-аналізатора Beckman Coulter. Для напрацювання ДНК-аналітів застосовано набір для секвенування GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit from Beckman Coulter. Отримані зразки були очищені шляхом преципітування й відмивки етанолом та аналізувалися за розподіленням у капілярах ДНК-аналізатора, заповнених поліакриламідним гелем.

Послідовності з хроматограм ДНК-аналізу переводили до FASTA-формату, після чого аналізували за допомогою програм BioEdit (корегування і множинне вирівнювання) й MEGA 5.1 (побудова філогенетичного дерева та його аналіз).

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі досліджень зі зразків периферичної крові було екстраговано сумарну ДНК, у т. ч. провірусну ДНК вірусу лейкозу ВРХ. Після ампліфікації мінливої ділянки гена *pol* за допомогою системи праймерів BLV3 фрагменти специфічної довжини (440 п.н.) виявлено у 4 з 16 зразків господарства 1 (Харківська обл.), 8 з 12 зразків з господарства 2 (Харківська обл.) та 6 з 10 зразків з господарства 3 (Сумська обл.). Окрім того, було отри-

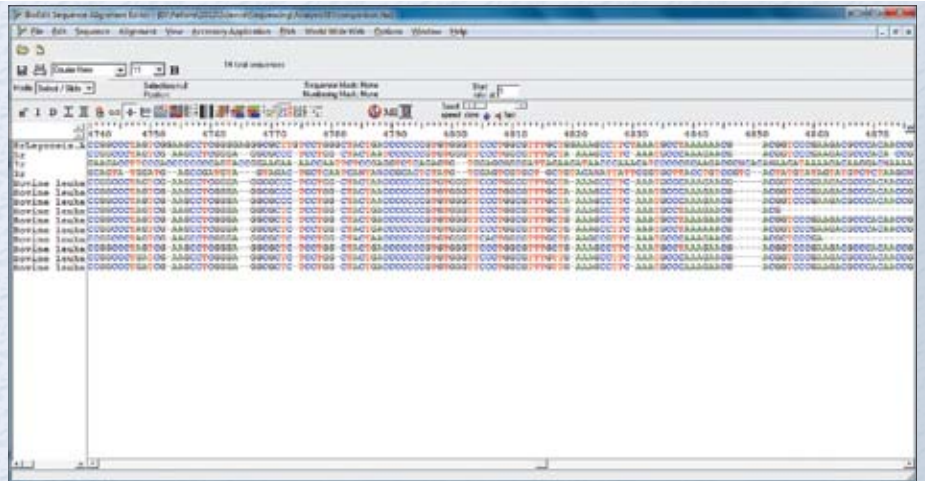


Рис. 1. Множинне вирівнювання послідовностей гена *pol* українських і європейських ізолятів ВЛ ВРХ (8r – BLV clone IECVM, 5r – Kh2, 7r – Su, 3r – Kh1)

мано фрагмент специфічної довжини з культури FLK-BLV, клону, який зберігається в колекції перещеплюваних ліній ННЦ «ІЕКВМ».

Отримані амплікони було екстраговано з гелів і використано для подальших досліджень. Після реакції хімічного секвенування й очищення з використанням етанолу було проведено їх електрофоретичний аналіз у секвенаторі. Ці дослідження дозволили отримати низку хроматограм різної якості, зокрема було отримано послідовності зразків з прямого та зворотного праймерів з кожного із трьох господарств та з культури FLK-BLV.

Після відповідного корегування й вирівнювання отримано чотири консенсусні послідовності завдовжки 280–440 п.н. За результатами аналізу в програмі BLAST у режимі on-line за алгоритмом blastn показано відповідність отриманих даних послідовностям матриць провірусної ДНК гена вірусу лейкозу ВРХ.

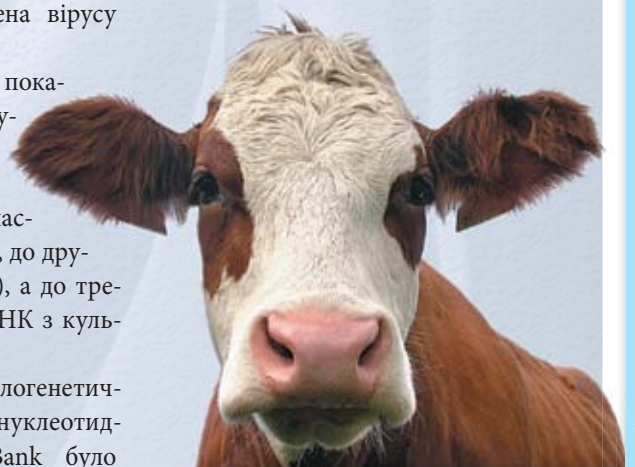
Аналіз послідовностей показав, що вони умовно формують три групи: до першої увійшли ізоляти, виявлені на території Харківської області (позначені як Kh1 та Kh2), до другої – ізолят із Сумської (Su), а до третьої – зразок провірусної ДНК з культури FLK-BLV.

З метою подальшого філогенетичного аналізу з бази даних нуклеотидних послідовностей GenBank було

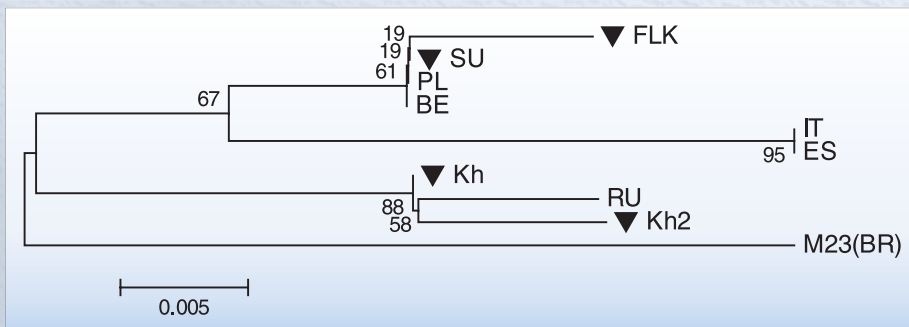
отримано послідовності гена *pol* ізолятів вірусу, ідентифікованих на території Європи (PL, RU, BE, IT, ES) та Південної Америки (BR). Множинне вирівнювання дозволило визначити в послідовностях гена *pol* декілька інсерцій (рис. 1).

Отримане вирівнювання було імпортоване до програми MEGA 5.1 й проаналізоване за алгоритмом Neighbor Joining з метою побудови філогенетичного дерева. Як послідовність-поляризатор використано секвенований фрагмент ізоляту бразильського походження.

Встановлено наявність двох основних кластерів у вірусній популяції за філогенетичним розподілом послідовностей гена *pol* (рис. 2). До першого з них увійшов російський ізолят вірусу лейкозу, що є типовим представником субпопуляції збудника, яка циркулює в європейській частині Російської Федерації. Спорідненість до нього показали ізо-



УВАГА! ТРИВАЄ ПЕРЕДПЛАТА НА ЖУРНАЛ НА 2013 РІКІ



**Рис. 2.** Філогенетичні зв'язки польових ізолятів ВЛ ВРХ за послідовностями гена *pol* (▼ – позначення українських ізолятів)

ляти, виявлені в господарствах Харківської області. Дивергенція всередині групи при цьому становила менше 1% (рис. 2).

Друга гілка була більш варіабельною, оскільки вміщувала два клади: південноєвропейські ізоляти та ізоляти з центру Європи. Дивергенція всередині кладів становила 0–0,6%, а між цими групами – до 4%. Ізолят Su, який входив до цієї групи, був філогенетично найближчим до збудників із Польщі та Бельгії (рівень нуклеотидних відмінностей < 0,01%).

Послідовність гена *pol* з культури клітин FLK BLV мала 0,7% дивергенцію щодо цих ізолятів.

Дослідження буде продовжено в напрямі розширення спектра аналізованих ізолятів та із залученням до порівнянь послідовностей інших генів ВЛ ВРХ.

### ВИСНОВОК

За філогенетичним аналізом гена *pol* епізоотичних ізолятів ВЛ ВРХ встановлено спорідненість їх із центральноєвро-

пейськими та російськими штамми вірусу. Дивергенція між послідовностями аналізованого гена становила 0,01–0,8%.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Dube S.** Degenerate and specific PCR assays for the detection of bovine leukaemia virus and primate T cell leukaemia/lymphoma virus *pol* DNA and RNA: phylogenetic comparisons of amplified sequences from cattle and primates from around the world [Текст] / S. Dube, S. Bachman, T. Spicer // *J. of General Virology*. – 1997. – Vol. 78. – P. 1389–1398.
2. **Parvin J.** Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1 [Текст] / J. Parvin, A. Moscona, W. Pan // *J. Virol.* – 1985. – Vol. 59. – P. 377–383.
3. **Steinhauer D.** Extreme heterogeneity in a population of vesicular stomatitis virus [Текст] / D. Steinhauer, J. de la Torre, E. Meier, J.J. Holland // *J. Virol.* – 1989. – Vol. 63. – P. 2072–2080.
4. **Steinhauer D.** Rapid evolution of RNA viruses [Текст] / D. Steinhauer, J.J. Holland // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1987. – Vol. 41. – P. 409–433.

Одержано 26.11.2012

**Полиморфизм гена *pol* вірусу лейкоза крупного рогатого скота.** А.П. Герілович, Б.Т. Стегний, О.Ю. Лиманська, С.К. Горбатенко, А.І. Гриневич, І.Г. Маркович, І.В. Полищук, З.А. Яцук

Возбудитель лейкоза крупного рогатого скота як представитель РНК-содержащих вірусів характеризується достатньою високою генетичною варіабельністю, що обумовлює значительну інформативність філогенетичних досліджень його популяцій. Стаття посвячена характеристиці послідовностей гена *pol* вірусу лейкоза КРС довжиною 440 п.н. з трьох господарств східного регіону України. Встановлено генетична гомологія послідовностей характеризуємих ізолятів з популяціями вірусів, циркулюючих на території Європи та європейської частини Російської Федерації.

**Polymorphism of the *pol* gene of bovine leukemia virus.** A.P. Gerilovych, B.T. Stegnyy, O.Yu. Limanskaya, S.K. Gorbatenko, O.J. Grynevych, I.G. Markovych, I. V. Polishchuk, S.O. Jatsuk

The causative agent of bovine leukemia as a representative of RNA-containing viruses has significant levels of genetic variability, which leads to very informative phylogenetic studies of its populations. The paper is devoted to *pol* gene sequences of bovine leukemia virus comparison from three farms Eastern Ukraine due 440 bp fragment of proviral DNA. Established genetic homology of sequences characterizes isolates as related to populations of viruses circulating in Europe and the European part of the Russian Federation. ☉

