

УДК:578.08:578.823.91

*Особенности выделения РНК реовируса из клинического материала.*

Колпаков Сергей Анатольевич, Колпакова Елена Павловна.

*Аннотация:*

Главной целью исследования было выяснение причины неудач при попытке выделения РНК реовируса из клинического материала от больных. В ходе работы выяснилось, что транскриптаза (РНК зависимая РНК полимеразы) из-за чрезвычайно короткого времени активации после нарушении целостности внешнего капсида реовируса очень быстро превращает двухцепочечные РНК в одноцепочечные, невидимые при стандартном способе проведения и регистрации электрофореза. Добавление транскриптазы с функцией полимеразы в уже готовые пробы или в клинический материал от больных перед процедурой выделения РНК приводит к превращению одноцепочечных РНК (если они там присутствуют) в двухцепочечные, выявляемые после электрофореза в виде сегментов генома.

Разработанный метод визуализации реовирусной РНК может помочь при этиологической диагностики реовирусной инфекции у больных и изучении реовируса как патогена.

*Ключевые слова:* Ключевые слова: гепатит, реовирус, транскриптаза, диагностика.

*Abstract:* Key objective of the given research is to find out reasons of failures during extraction of the RNK reoviruse from sick people clinical material. In due course it was discovered that transcriptase (RNA dependent RNA polymerase) very quickly transforms double-stranded RNA into a single-stranded RNA due to short time of activation after violation of reoviruse outside capsid integrity. This single-stranded RNA is invisible using standard way of electrophoresis registration. Addition of a transcriptase with polymerase function in ready-made samples or in clinical material from sick people before RNA extraction leads to transformation of a single-stranded RNA (if available) into a dsRNA identified after electrophoresis in the form of genome's segments. The developed RNA visualisation method could assist in etiological diagnostics of reoviral infection and in studying of reovirus as a pathogen.

*Key words:* a hepatitis, a reovirus, a transcriptase, diagnostics.

## **Введение**

Реовирусы широко распространены в природе и являются по данным многочисленных авторов причиной острых инфекционных заболеваний у взрослых и детей, вызывая поражения органов дыхания и желудочно-кишечного тракта. Имеются отдельные сообщения о том, что некоторые заболевания печени, головного мозга, лимфоидной, сердечно-сосудистой и эндокринной систем могут быть связаны с

реовирусом, однако однозначно это не доказано и требует дополнительных исследований [3, 5]. Занимаясь проблемой вирусных гепатитов неустановленной этиологии, нам удалось выделить от гепатитного больного реовирус и на его основе создать тест-систему, позволяющую диагностировать все заболевания реовирусной этиологии. Однако попытки подтвердить обнаружение реовируса у больных выделением его РНК из клинического материала совершенно неожиданно закончились неудачей. Выяснение причин таких непонятных результатов позволило выявить некоторые неизвестные ранее свойства транскриптазы реовируса, чему и посвящено настоящее сообщение.

## Материалы и методы

*Культуры клеток.* В работе использовали культуру перевиваемых клеток эмбриона свиньи, культивируемую на среде 199 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота.

*Вирусы.* Фекальные 10 % суспензии готовили по обычной методике. Перед заражением клетки три раза промывали раствором Хенкса и наслаивали суспензии фекалий больных, в которых методом электронной микроскопии (ЭМ) были обнаружены реовирусы. После контакта восстанавливали первоначальный объём питательной средой без сыворотки и оставляли в термостате при 37 °С.

Каждый пассаж контролировали на наличие реовируса методом ЭМ на микроскопе УМВ-100К при инструментальном увеличении 65000-85000.

*Выделение РНК.* РНК реовирусов выделяли, как описано в [1] с незначительными авторскими модификациями, заключающимися в повышении температуры на стадии депротенинизации пробы до 65 градусов и понижении температуры при центрифугировании РНК в спирто-соляном растворе на последней стадии её выделения до минус 4 °С. Это обеспечивает получение более чистого и концентрированного раствора вирусной РНК.

*Электрофорез.* Для разделения фрагментов вирусной РНК использовали систему Леммли (изначально предназначенную для разделения белков). Вертикальный электрофорез проводили в 8% полиакриламидном геле (ПААГ) (рН-8,8) с концентрирующим 4% гелем (рН-5,8) при токе 10 мА в течение 15-24 часов [2].

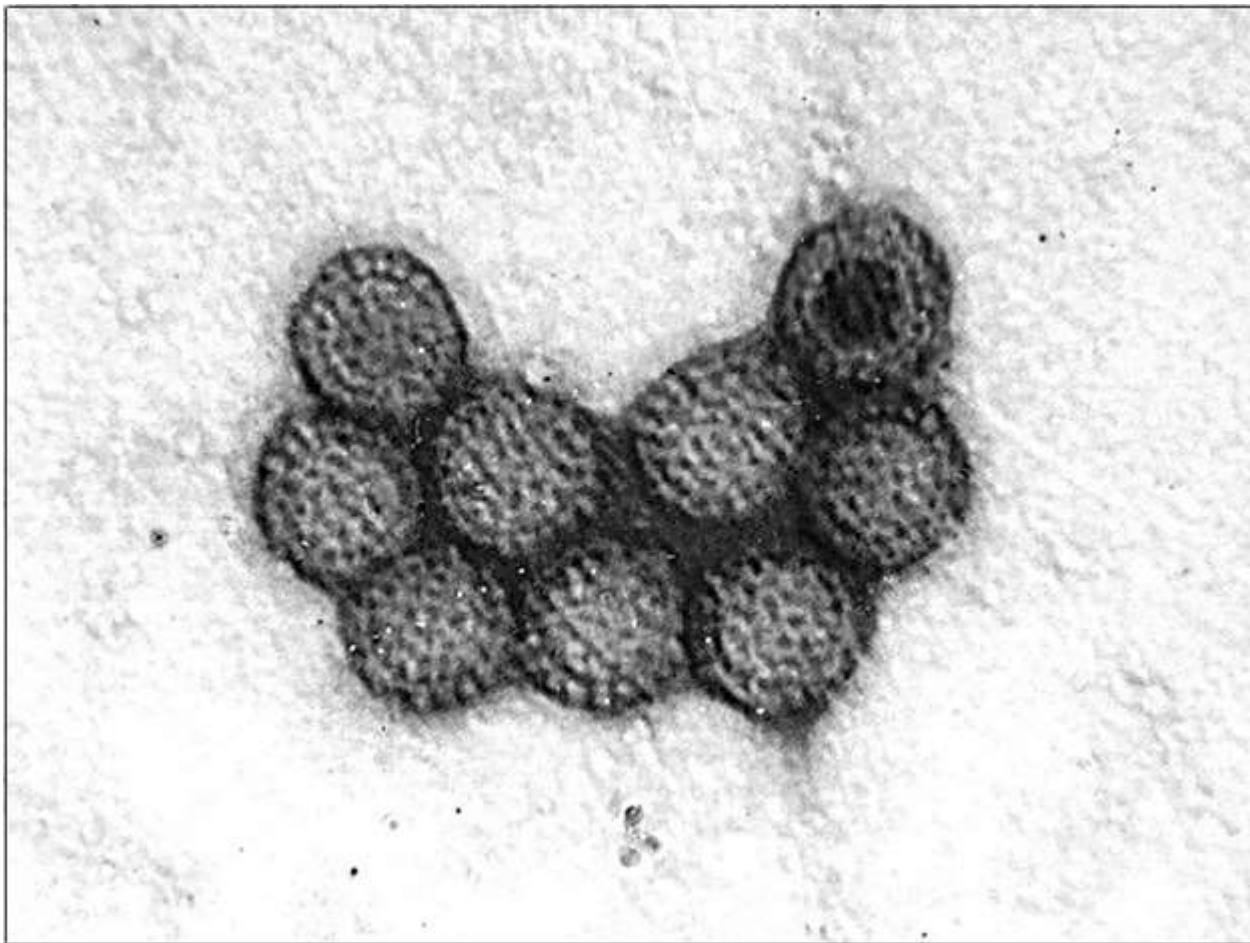
*Диагностикумы.* Для детекции реовирусов, кроме ЭМ, использовали разработанный нами антительный эритроцитарный диагностикум «Реотест» для реакции непрямой (опосредованной через эритроциты) гемагглютинации (РНГА).

Диагностикум представляет собой 1% взвесь фиксированных эритроцитов барана, сенсibilизированных  $\gamma$ -глобулиновой фракцией асцитной жидкости белых крыс, иммунизированных реовирусом.

*Животные.* Использовали белых беспородных крыс весом 120-150 гр. Для получения иммунного сырья иммунизировали животных культуральным реовирусом, чередуя внутримышечное и внутрибрюшинное введение антигена. После 8-ой иммунизации животным вводили в брюшную полость опухоль яичника крыс и через 10-15 дней собирали иммунное сырьё в виде иммунной асцитной жидкости.

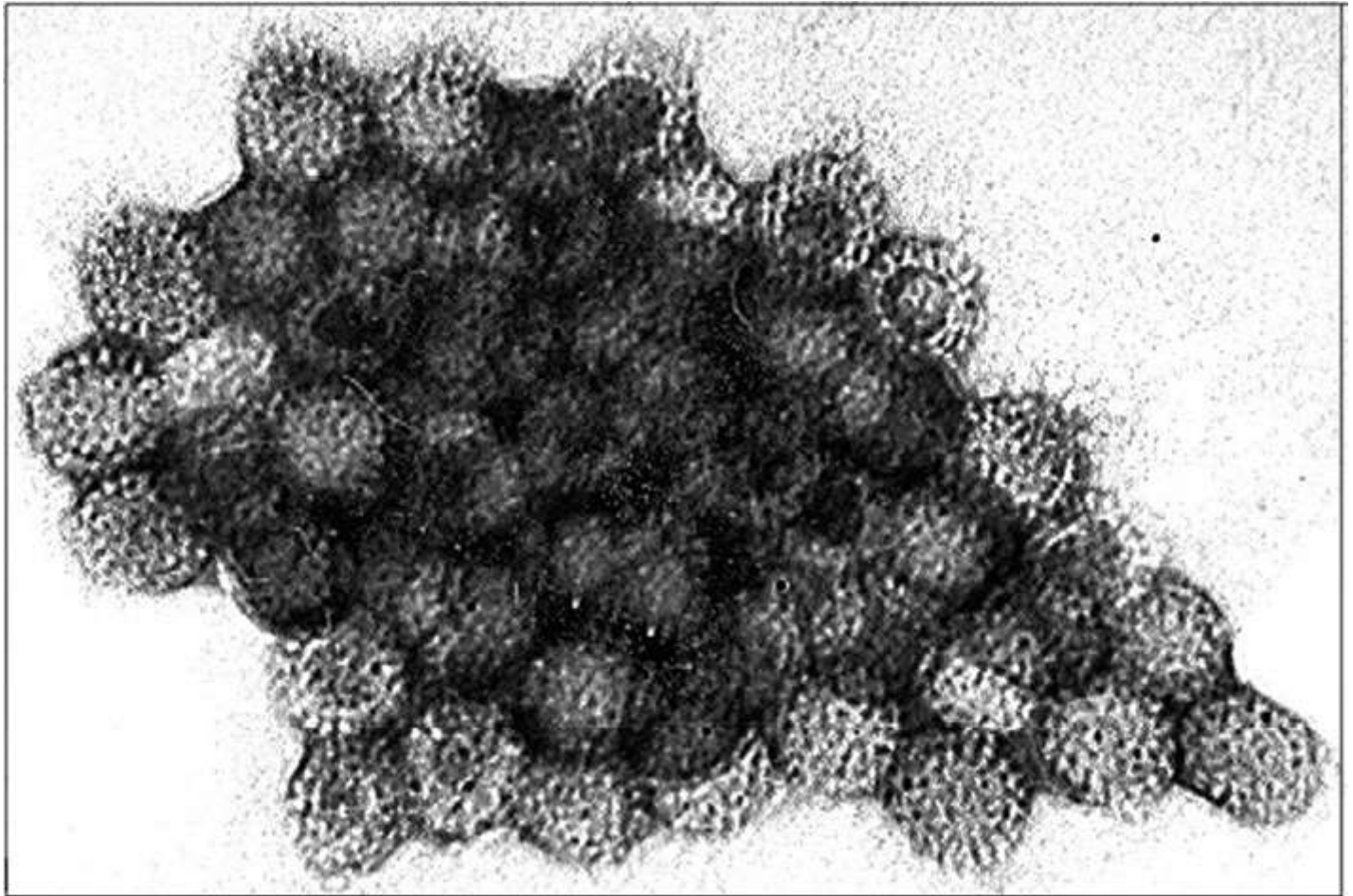
## Результаты

Работая с клиническим материалом из гепатитного отделения городской больницы, нам удалось выделить из фекальной суспензии больного гепатитом неустановленной этиологии реовирус (рис.1).



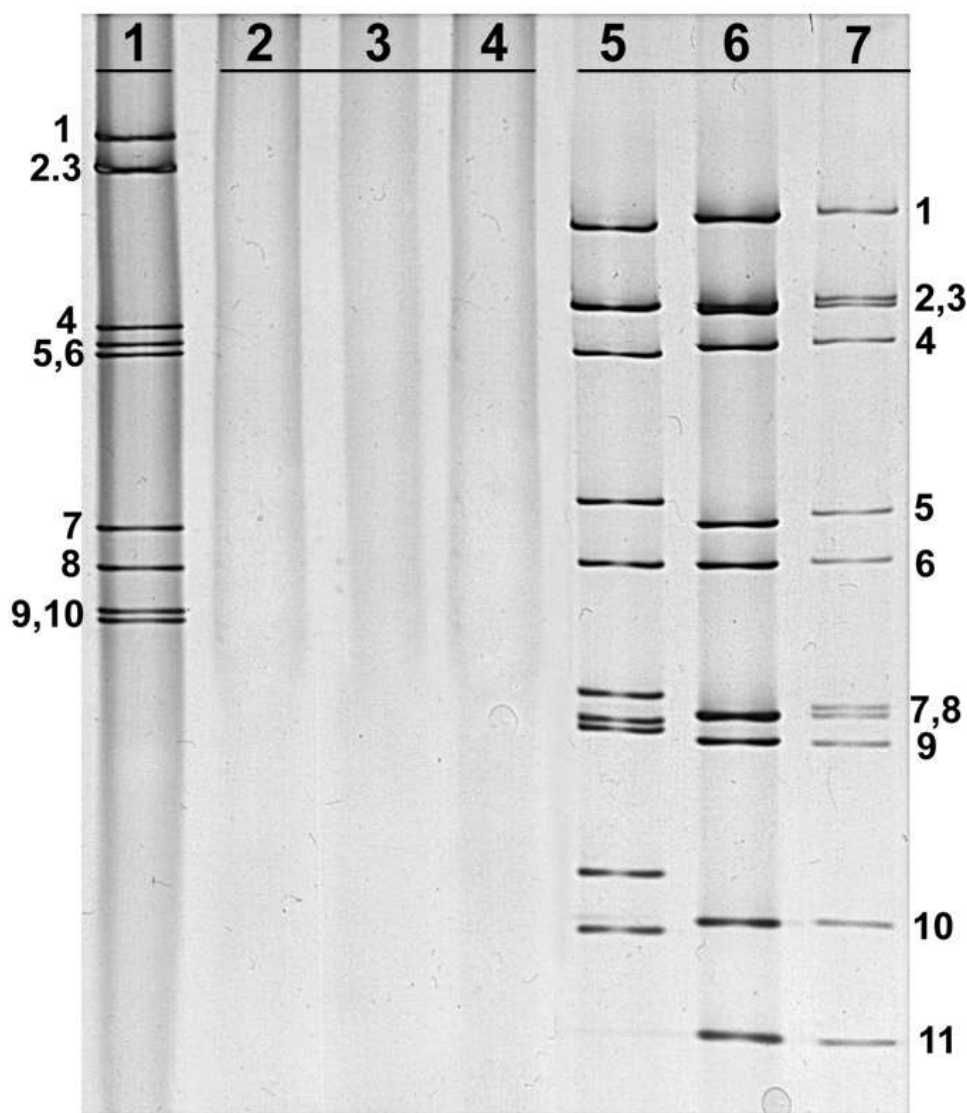
*Рисунок 1. Электронномикроскопическая фотография: Культуральные реови-русы человека. Негативное контрастирование. Увеличение 165 000.  
Препарат Колпакова С.А.*

После нескольких пассажей этот штамм был адаптирован к росту на перевиваемой культуре клеток. Урожай реовируса на уровне 8 пассажа составил  $1 \cdot 10^9$  вирионов в 1мл. Этиологическая роль реовируса в возникновении гепатита была доказана методом иммуноэлектронной микроскопии (ИЭМ) со 2-ой сывороткой крови реконвалесцента. Агглютинация вирионов реовируса, несмотря на разведение сыворотки в 4000 раз, была настолько выраженной, что очень часто обнаруживались конгломераты, содержащие до 500-800 и более вирусных частиц (рис.2).



*Рисунок 2. Электронномикроскопическая фотография: иммуноэлектронная микроскопия культуральных реовирусов человека со 2-ой сывороткой больного. Негативное контрастирование. Увеличение 145 000. Препарат Колпакова С.А.*

При этом ИЭМ с первой сывороткой, взятой в начале болезни, была отрицательной. Изучение выделенного и адаптированного культурального штамма реовируса методом электрофореза (ЭФ) РНК в полиакриламидном геле (ПААГ) в системе буферных растворов по U. Laemmly показало, что распределение всех 10-и генов по группам и молекулярным массам соответствует таковым для всех реовирусов (рис.№3, трек №1) [4, 6].



*Рисунок 3. Электрофореграммы РНК: 1- культурального реовируса человека; 2-4- реовирусов из фекальных суспензий; 5- 7- ротавирусов человека группы А из фекальных суспензий. Первая колонка цифр показывает номера генов рео-вируса, а вторая - номера генов ротавирусов группы А. ПААГ- 8%. I- 10,0 мА, h-16 час. Препарат Колпакова С.А.*

На основе этого вируса нами был создан новый эритроцитарный диагностикум для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) – «Реотест». Диагностикум показал высокую чувствительность, выявляя 2 нг вирусного белка и 100 % специфичность, реагируя только с реовирусами и не реагируя с ротавирусами, аденовирусами, коронавирусами и энтеровирусами. Изучение клинического материала в РНГА с новым диагностикумом позволило безошибочно выявлять все случаи заболеваний реовирусной этиологии, при этом каждое выделение реовируса в РНГА было подтверждено его выявлением методом ЭМ.

Неожиданности начались после того, как мы решили сравнить методом ЭФ характер распределения РНК реовирусов, обнаруженных в фекальных суспензиях

больных методами РНГА и ЭМ, с профилем миграции генома нашего культурального реовируса. РНК реовируса из 10 % фекальных суспензий и культуральной вирусосодержащей жидкости выделяли безфенольным методом, как описано в [5] с небольшими авторскими модификациями.

Отобрав несколько проб, в которых по данным РНГА и ЭМ было обнаружено большое количество реовируса, мы выделили из них РНК и проводили ЭФ в ПААГ. В качестве эталона использовали РНК нашего культурального реовируса. После завершения фореа гели окрашивали 0,2% раствором азотнокислого серебра.

Результаты ЭФ показали чёткое разделение фрагментов РНК культурального реовируса и пустые дорожки с фекальными пробами, в которых по данным РНГА и ЭМ был обнаружен реовирус рис.3 (треки №1 и №2, №3, №4). В этом же геле мы выявляли из нескольких фекальных проб РНК ротавируса человека группы А, все 11 генов которых отчётливо видны на электрофореграмме (треки №5, №6 и №7). Как такое можно объяснить, было совершенно непонятно, поскольку известно, что геном реовируса также как и геном ротавируса человека представлен двухцепочечной сегментированной РНК, а способ её выделения из фекальных проб был один и тот же. Повторив этот опыт несколько раз с тем же результатом, стало понятно, что это не простая ошибка, а закономерность, которая требует своего объяснения.

Из работ многочисленных авторов известно, что при нарушении внешнего капсида реовируса активируется находящаяся в вирионе транскриптаза - РНК зависящая РНК полимеразы, расплетающая двойные цепи геномной РНК для синтеза их одноцепочечных копий, необходимых для воспроизводства вирусного потомства. Если допустить, что одноцепочечные РНК при этом выходят во внешнюю среду (в живую клетку или в реакционную среду при выделении РНК), то становится понятным, почему они не выявляются после ЭФ, - одноцепочечные РНК при таком режиме проведения ЭФ и методе окрашивания остаются невидимыми. Однако, как известно, таких проблем не возникает при выделении из фекальных суспензий РНК значимых для человека ротавирусов групп А, В и С, что вступает в явное противоречие с вышесказанным.

На наш взгляд, объяснить такие противоречивые факты можно, лишь введя новое понятие, – **время активации вирионной транскриптазы**, что может быть связано как с программой работы самого фермента, так и с вирионом в целом. Время активации транскриптазы реовирусов мы отнесли к быстрому, а ротавирусов - соответственно к медленному. При медленной активации фермента двойные спирали РНК долго, по крайней мере, на время их выделения остаются в нативном виде, что и позволяет увидеть их после ЭФ (рис.3, треки № 5-7). А быстрой активацией транскриптазы можно объяснить неудачи с выделением РНК реовирусов из фекальных суспензий (рис.3, треки № 2-4).

Здесь необходимо пояснить, что процесс выделения РНК состоит из 2-х стадий - на первом этапе с помощью ДСН и высокой температуры разрушаются все белки вириона (в том числе и транскриптаза) и после центрифугирования сбрасываются. На втором этапе охлаждённым спиртом осаждается находящаяся в надосадке РНК. При

этом, если транскриптаза с быстрой активацией, находящаяся в вирионе, превратила на 1-ом этапе двухцепочечные РНК в одноцепочечные, то снова стать двухцепочечными они уже не смогут по указанной выше причине. Если же активация транскриптазы медленная, то она просто не успевает на первом этапе ничего сделать с генами, и они остаются без изменения в виде двойных спиралей РНК, видимых после ЭФ (рис. №3, треки № 5- 7).

Понятно, что такая ситуация не могла бы произойти с культуральными реовирусами во время выделения РНК: - при выходе в реакционную среду из вириона одноцепочечных РНК они тут же вновь собираются в двухцепочечные РНК транскриптазой с функцией полимеразы, появляющейся в клетке перед "сборкой" вирусных частиц, незадолго до её гибели.

Подтверждение данных рассуждений представлено на рис. № 3 (трек №1).

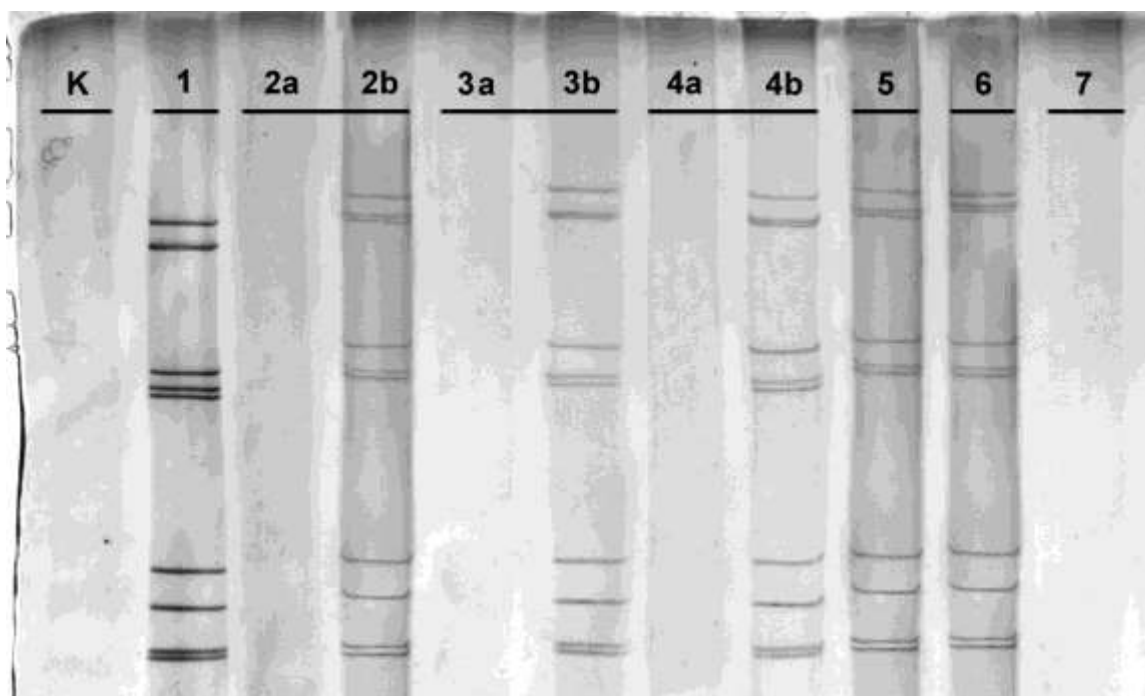
Исходя из этого, можно предположить, что если к уже готовым пробам, выделенным из фекальных суспензий ранее (положительных на реовирус в РНГА и ЭМ) и содержащих (пока теоретически) одноцепочечные РНК реовируса добавить небольшое количество транскриптазы (полимеразы), то вскоре из одноцепочечных РНК должны будут образоваться двухцепочечные гены реовируса, которые можно будет увидеть после ЭФ в том случае, если это предположение верно.

Для проверки данного предположения к 15 мкл ранее приготовленных из фекальных суспензий проб, положительных на реовирус в РНГА и ЭМ, и отрицательных на РНК реовируса при обычном ЭФ добавляли 5 мкл транскриптазы и оставляли на 20 мин для контакта в термостате при +37° С.

Известно, что все структурные компоненты вирусов, в том числе и транскриптаза (полимераза) синтезируются с большим запасом и поэтому после гибели клетки избыточное количество полимеразы оказывается в культуральной жидкости, которую мы и использовали в качестве источника реовирусной транскриптазы (далее просто транскриптаза).

Культуральную вируссодержащую жидкость, освобождали от вирионов и обломков клеток путём ультрацентрифугирования. Отсутствие вируса и его РНК контролировали ЭМ и ЭФ соответственно.

По истечении времени контакта проводили ЭФ в следующем режиме: проба, содержащая РНК культурального реовируса ставилась как обычно, а каждая проба, содержащая РНК реовируса из фекальных суспензий, ставилась одновременно в двух видах- до и после воздействия транскриптазы. Когда закончился ЭФ и гель был окрашен, результаты подтвердили наше предположение о важном значении быстрой и медленной активации транскриптазы, так как именно с этим и были связаны неудачи выделения генов реовирусов из фекальных суспензий. На электрофореграмме (рис.4) отчётливо видны фрагменты РНК фекального реовируса (треки № 2б, № 3б и № 4б), причём всё это только в том случае, если пробы были дополнительно обработаны транскриптазой.



*Рисунок 4. Электрофореграмма РНК: 1- культурального реовируса человека; 2-4- реовирусов из фекальных проб: а- пробы не обработаны полимеразой, б- пробы после контакта с полимеразой; 5-6- перед выделением РНК реовирусов полимеразы добавлена в фекальные пробы; 7- реовируса из фекальной пробы, обработанной панкреатической РНК-азой перед добавлением полимеразы. К – контроль полимеразы реовируса. ПААГ- 8%. I-10,0 мА, t-18 час. Препарат Колпакова С. А.*

Такой же положительный результат можно получить, добавив транскриптазу (20 мкл) перед стандартной процедурой выделения РНК в фекальные суспензии, в которых методами РНГА и ЭМ были обнаружены реовирусы (рис.4, треки №5 и № 6).

Для чистоты эксперимента, хотя и известно, что в эукариотической клетке нет и никогда не было ферментов, способных "работать" с двухцепочечными РНК, мы повторили опыт, представленный на рис.4, но вместо вирусной транскриптазы взяли культуральную жидкость нормальной культуры СПЭВ, клетки которой были разрушены путём замораживания-оттаивания. Как и следовало ожидать, гены реовируса после ЭФ не появилась, а это может говорить о том, что именно вирусная транскриптаза (полимераза) объединяет одноцепочечные РНК в двухцепочечные, которые затем можно увидеть в виде генов после ЭФ.

Убедится в том, что фекальных пробах РНК находится в одноцепочечной форме довольно просто, - достаточно обработать их ферментом РНК-азой, разрушающей одноцепочечные РНК. Если РНК действительно одноцепочечная, то она будет разрушена РНК-азой и полимеразе, добавленной в пробу после этого не из чего будет собрать двухцепочечные гены, то есть, после ЭФ треки с пробами окажутся пустыми. На рис.4 представлен результат воздействия на фекальную пробу, в которой в РНГА и ЭМ был обнаружен реовирус, панкреатической РНК-азы из поджелудочной железы



свиней, что привело к полному разрушению РНК (трек №7), а такое возможно лишь в том случае, если она одноцепочечная.

Таким образом, проведённая работа позволила получить новые научные данные о функционировании вирусной транскриптазы (полимеразы), применение которых дало возможность выделять РНК реовирусов из клинического материала.

Необходимо отметить, что диагностика даже тех нозологических форм заболеваний, где роль реовируса доказана, является достаточно трудной задачей и обнаружение самого реовируса как причины заболевания часто носит спорадический характер.

Разработанный нами метод визуализации реовирусной РНК, учитывая потенциальную способность реовируса вызывать у человека заболевания различных органов и систем, может помочь при этиологической диагностики реовирусной инфекции у больных и дальнейшем изучении реовируса как патогена.

Полученные результаты, на наш взгляд, достаточно интересны и требуют дополнительных исследований.

## Список литературы

1. Новикова Н.А., Епифанова Н.В., Романова Т.В., Макеева Л.В., Животовский М.В. Ротавирусный гастроэнтерит. Пособие для врачей. Нижний Новгород. 1999. 20с.
2. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T-4. Nature. 227, 681.
3. Morecki R., J. H. Glaser, S. Cho, W.F. Balisteri, M.S. Horwitz. 1982. Biliary atresia and reovirus type 3 infection. N. Engl. J. Med. 307, 481.
4. Raine C. S., B. N. Fields. 1974. Neurotropic virus- host relationship alterations due to variation in viral genome as studied by electron microscopy. J. Pathol. 75, 119.
5. Rosen L., H. E. Evans, A., Spickard. 1963. Reovirus infections in human volunteers. AM J. Hyg. 77, 29.
6. Shatkin A. J., J. D. Sipe, P. C. Loh. 1968. Separation of 10 reovirus genome segments by polyacrylamide gel electrofophoresis. J. Virol. 2, 986.

## Spisok literaturi

1. Novikova N.A., Epifanova N.V., Romanova T.V., Makeeva L.V., Zhivotovskij M.V. Rotavirusnyj gastroenterit. Posobie dlya vrachej. Nizhnij Novgorod. 1999. 20p.
2. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T-4. Nature. 227, 681.
3. Morecki R., J. H. Glaser, S. Cho, W.F. Balisteri, M.S. Horwitz. 1982. Biliary atresia and reovirus type 3 infection. N. Engl. J. Med. 307, 481.
4. Raine C. S., B. N. Fields. 1974. Neurotropic virus- host relationship alterations due to variation in viral genome as studied by electron microscopy. J. Pathol. 75, 119.

5. Rosen L., H. E. Evans, A., Spickard. 1963. Reovirus infections in human volunteers. *AM J. Hyg.* 77, 29.
6. Shatkin A. J., J. D. Sipe, P. C. Loh. 1968. Separation of 10 reovirus genome segments by polyacrylamide gel electrofophoresis. *J. Virol.* 2, 986.