

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МАЛЫХ РНК В ПОЛИЭДРАХ ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА *Bombyx mori*

Т. В. ШИРИНА, А. В. ГЕРАЦЕНКО, М. Т. БОБРОВСКАЯ, В. И. КАШУБА

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: t.v.shirina@inbox.ru*

Биоинформативными методами показано, что в участках генома вируса ядерного полиэдроза *Bombyx mori* закодированы две малые РНК – *snc RNA-1* и *snc RNA-2*, которые могут выполнять структурную функцию при формировании кристаллов полиэдров. Целью работы является установление нуклеотидной последовательности малых некодирующих РНК, предсказанных биоинформативными методами, из полиэдров *B. mori*. В работе использованы полимеразная цепная реакция (ПЦР), электрофорез в агарозном геле, клонирование продуктов ПЦР, секвенирование.

Установлено, что нуклеотидные последовательности *snc RNA-1* и *snc RNA-2* комплементарны участкам мРНК полиэдрина, которые включаются в полиэдры *B. mori*. Эти РНК имеют 100%-ю идентичность с последовательностями, предсказанными нами биоинформативными методами. Полученные результаты подтверждают предложенный нами ранее биоинформативный подход по поиску малых РНК, закодированных в геноме *B. mori*.

Ключевые слова: вирус ядерного полиэдроза, *Bombyx mori*, полиэдрин, малые некодирующие РНК, секвенирование.

Бакуловирусы (*Baculoviruses*, baculum – палочка) – это семейство крупных ДНК-содержащих вирусов, поражающих только насекомых. Геном бакуловирусов представлен в виде двухцепочечной кольцевой ковалентно замкнутой ДНК длиной от 80 до 220 т.п.н. с \approx Мм 200 тыс. кДа. Инфекция вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) характерна тем, что на поздних стадиях в ядрах клеток насекомых образуются тела включения, представляющие собой протеиновые кристаллы в форме полиэдров. Полиэдрин ВЯП тутового шелкопряда с Мм 28,5 кДа при кристаллизации захватывает вирионы. После гибели гусениц полиэдры попадают во внешнюю среду и служат источником распространения инфекции при питании гусениц.

Полиэдры ВЯП *Bombyx mori* кроме вирионов включают в себя РНК [1]. Предполагалось, что это фрагменты РНК, случайно захваченные полиэдрами при кристаллизации. Установлено, что низкомолекулярная РНК не является случайным компонентом и обнаруживается постоянно у разных бакуловирусов в количествах от 1,0 до 1,5% [2–5]. Однако последовательность малой РНК не была установлена. Недавнее открытие

у эукариотов и у крупных ДНК-содержащих вирусов малых РНК, играющих регуляторную роль во многих клеточных процессах и во взаимоотношениях вирус – клетка [6], послужило причиной для возобновления исследований. Нами было показано, что полиэдры ВЯП *B. mori* содержат две малые РНК в виде рибонуклеопротеидных комплексов с молекулярной массой 17 и 21 кДа [7].

Биоинформативными методами нами показано, что в состав полиэдров могут включаться две малые РНК: *snc RNA-1* длиной 54 нуклеотида (нт) GUCUUGUUCAUGUUCGACUAGGUCUUCUUGCGCUUGGCGUUUUUGAUUAAGAC и РНК длиной 64 нт *snc RNA-2* ACGCAAAAACUCUUUGCCGCUCCAGUUGACGAUUAACUUC AUGGUAUCGGGUUCACACUGCGA [8]. Величины этих РНК коррелируют с малыми РНК с молекулярной массой 17 и 21 кДа соответственно.

Мы предположили, что именно эти *snc RNA-1*, *snc RNA-2* входят в состав рибонуклеопротеидных комплексов и участвуют в формировании кристаллической решетки полиэдров ВЯП *B. mori* на заключительной стадии инфекции [9, 10].

В работе [9], основываясь на результатах электронно-микроскопических исследований структуры полиэдров Харрапа [11], мы предложили модель формирования кристаллической решетки полиэдров и участия snc RNA-1 и snc RNA-2 в сборке кристалла на заключительной стадии инфекции у *B. mori*. Выполняют ли такую же функцию малые РНК в полиэдрах других вирусов не известно.

Для подтверждения того, что в состав полиэдров входят snc RNA-1 и snc RNA-2 необходимо выделить, клонировать и определить нуклеотидную последовательность этих РНК. Поэтому целью данной работы является установление нуклеотидной последовательности малых РНК из полиэдров ВЯП *B. mori* и доказательство их идентичности с ранее предсказанными последовательностями биоинформативными методами.

Материалы и методы

Для выделения РНК в работе использовали полиэдры штамма ВЯП *B. mori* strain India из коконов кара-почах, не обладающие протеолитической активностью инфицированных ВЯП гусениц. РНК получали из 100 мг полиэдров и растворяли в 4 мл буфера (0,05 М Na₂CO₃, 0,05 М NaHCO₃, 0,1 М NaCl), pH 10,5 на магнитной мешалке в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее раствор полиэдров центрифугировали в течение 10 мин при 6000 об./мин для осаждения нерастворившейся фракции полиэдров, затем было проведено ультрацентрифугирование (30 000 об./мин 1 час при 4 °С), с помощью которого удаляли из раствора вирионы и продукты их деградации. Экстракцию РНК проводили дважды из надосадочной жидкости смесью фенола с хлороформом в соотношении 1 : 1. Для преципитации РНК образцы обрабатывали 2-кратным объемом охлажденного спирта. Далее образцы центрифугировали в течение 10 мин при 6000 об./мин и осажденную РНК сушили на воздухе и растворяли в воде, обработанной диэтилпиروкарбонатом (DEPC-treated). Хранили образцы РНК при -70 °С.

Для удаления возможных примесей геномной ДНК вируса, РНК из полиэдров обрабатывали ДНКазой 1 (DNase I, RNase-free, #EN0521, Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя.

Синтез первой цепи кДНК осуществляли RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя со специфическими праймерами:

snc RNA-1: 5'- TCTTATCAAAAACGCCAAGC -3';
snc RNA-2: 5'- CGCAGTGTGAAACCCGAT-3'.

В обработанные ДНКазой 1 образцы РНК добавляли праймеры для синтеза кДНК и нагревали 5 мин до 65 °С, затем добавляли буфер, ингибитор РНКаз, смесь нуклеотидов, ревертазу. Синтез осуществляли при 42 °С в течение 1 часа. Пробы хранили при -20 °С.

Наработку транскриптов для клонирования проводили с помощью ПЦР с использованием Taq DNA Polymerase (recombinant) (# EP0401, Thermo Scientific). Для первого транскрипта (snc RNA-1) использовали следующие праймеры: snc RNA-1 For 5'-TCTTGTTCATGTTTCGACTAGGTG-3'; snc RNA-1 Rev 5'-GTCTTATCAAAAACGCCAAGC-3';

для второго транскрипта (snc RNA-2):
snc RNA-2 For 5'-TCTTTGCCGCTCCAGTTG-3';
snc RNA-2 Rev 5'-ATTCGAGTGTGAAACCCGAT-3'.

ПЦР проводили на амплификаторе BIS Thermocycler по следующей программе: 95 °С 2 мин, (95 °С 20 сек, 60 °С 15 сек, 72 °С 20 сек) 35 циклов, 72 °С 3 мин.

Электрофорез продуктов ПЦР проводили в 2%-ом агарозном геле в 1×ТАЕ буфере с бромистым этидием. Визуализацию ДНК в геле осуществляли на приборе ChemiDoc XRS+, Bio-Rad (США).

ПЦР-продукты из раствора осаждали гликогеном (Glycogen, Molecular Biology Grade, G1767, SYGMA) и клонировали в вектор pTZ57R/T с помощью InsTAclone PCR Cloning Kit (#K1213, Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя.

Выросшие на чашках колонии клеток *Escherichia coli* XL-1 blue использовали для наращивания количества плазмидной ДНК.

Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием GeneJET Plasmid Miniprep Kit (#K0502, Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя.

Секвенирование проводили на секвенаторе 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems/НУТАСИ, США) с использованием T7 праймера.

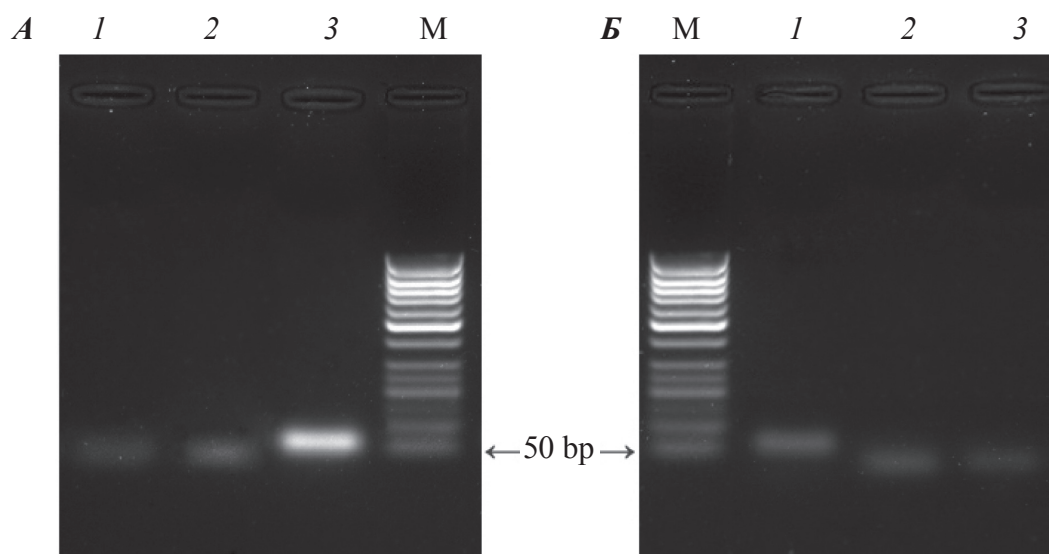


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов ПЦР из РНК полиэдров *B. mori*. А – ПЦР с праймерами к *spc RNA-1*: дорожка 1 – без матрицы (отрицательный контроль); дорожка 2 – РНК после обработки ДНКазой 1; дорожка 3 – кДНК из РНК, обработанной ДНКазой 1, М – ДНК маркер 50 bp – пар нуклеотидов (пн). Б – ПЦР с праймерами к *spc RNA-2*: дорожка 1 – кДНК из РНК, обработанной ДНКазой 1; дорожка 2 – РНК, обработанная ДНКазой 1; дорожка 3 – без матрицы (отрицательный контроль); М – ДНК маркер 50 пн

Результаты и обсуждение

Первым шагом установления последовательности малых РНК является выделение РНК из полиэдров двойной экстракцией фенолом для очистки проб от протеинов и геномной ДНК вируса и дополнительная обработка их ДНКазой 1 для удаления возможных остатков геномной ДНК вируса. Затем для проверки отсутствия геномной ДНК вируса в пробах РНК, обработанной ДНКазой 1 были проведены ПЦР с использованием в качестве матрицы: РНК, обработанная ДНКазой 1; кДНК из РНК, предварительно обработанной ДНКазой 1. Кроме того, для проверки чистоты праймеров, буфера и воды – поставлены реакции ПЦР без матрицы. Электрофореграммы данного эксперимента представлены на рис. 1 (А, Б).

Как видно на дорожках 2 (рис. 1, А, Б) отсутствуют специфические продукты ПЦР. Наблюдаемые полосы ниже 50 пн являются димерами праймеров. Отсутствие продуктов ПЦР свидетельствует о том, что в данных пробах нет геномной ДНК вируса *B. mori*. На дорожке 3 (рис. 1, А) и дорожке 1 (рис. 1, Б) имеется продукт ПЦР на уровне приблизительно 60 пн, подтверждающий, что полученные из кДНК продукты ПЦР, синтезированы полимеразой

именно из РНК. Кроме того, все реагенты, входящие в состав ПЦР реакции не являются контаминированными геномной ДНК вируса (рис. 1, А, дорожка 1 и рис. 1, Б, дорожка 3).

Таким образом, отсутствие геномной ДНК в пробах РНК полиэдров *B. mori* показало, что проведена очистка ПЦР продукта для клонирования в вектор pTZ57R/T и получения плазмидной ДНК в клетках *E. coli* XL-1 blue.

В результате клонирования были отобраны выросшие на чашках колонии клеток XL-1 blue. Для наращивания плазмидной ДНК отобраны

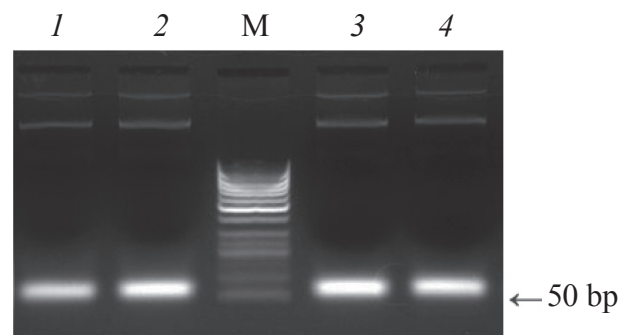


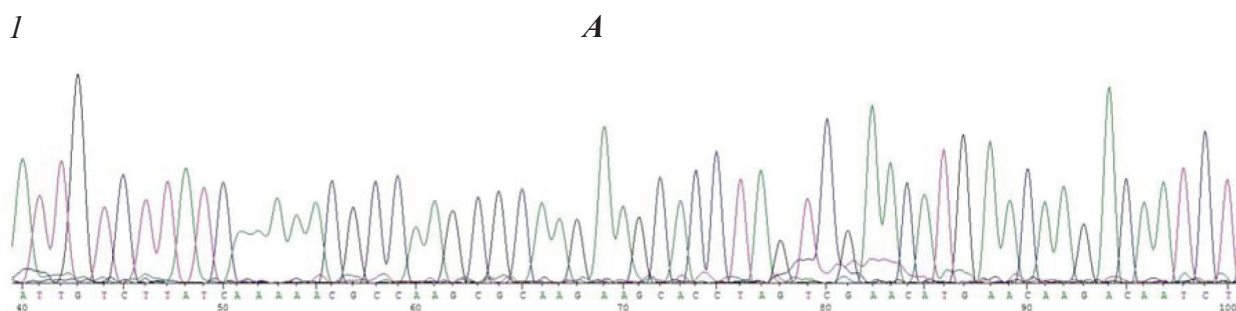
Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР с плазмидной ДНК, содержащей кДНК *spc RNA-1* (дорожки 1, 2) и *spc RNA-2* (дорожки 3, 4), М – ДНК-маркер 50 bp (пн)

по две колонии клеток, из которых выделили плазмидную ДНК. Для проверки наличия встроеного ПЦР продукта *snc RNA-1* и *snc RNA-2* в выделенных плаزمидах проведены ПЦР при тех же условиях, что и при наработке продуктов *snc RNA-1* и *snc RNA-2* для клонирования. Электрофореграмма продуктов ПЦР представлена на рис. 2.

Наличие продуктов на всех дорожках в районе 60 пн свидетельствует о встраивании в

вектор pTZ57R/Г продуктов ПЦР интересующих нас транскриптов РНК *snc RNA-1* и *snc RNA-2*.

Далее нами было проведено секвенирование этих образцов плазмидной ДНК. Примеры сиквенсов представлены на рис. 3 (А, 1 и Б, 1). Для установления идентичности секвенированных продуктов и геномной ДНК ВЯП *B. mori* было проведено выравнивание (alignment) секвенированных последовательностей с использованием программы Blast на сайте <http://blast>.



2

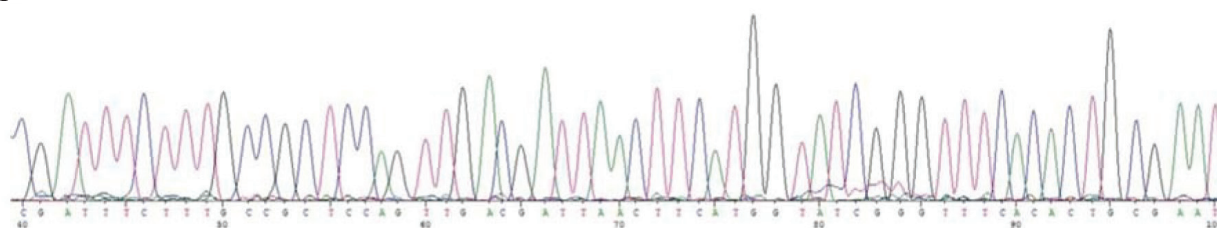
Bombyx mori NPV strain India, complete genome

Sequence ID: gb|JQ991010.1 Length: 126879 Number of Matches: 1

Праймеры: snc RNA-1 For snc RNA-1 Rev
 sncRNA-1 2 TCTTGTTTCATGTTTCGACTAGGTGCTTCTTGC GCTTGGCGTTTTTGATAAGAC 53
 |||
 st India 128 TCTTGTTTCATGTTTCGACTAGGTGCTTCTTTCGCGTTGGCGTTTTTGATAAGAC 77

1

Б



2

Bombyx mori NPV strain India, complete genome

Sequence ID: gb|JQ991010.1 Length: 126879 Number of Matches: 1

Праймеры: snc RNA-2 For snc RNA-2 Rev
 sncRNA-2 6 TCTTTGCCGCTCCAGTTGACGATTAACCTTCATGGT ATCGGGTTTCACACTGCGAAT 61
 |||
 st India 278 TCTTTGCCGCTCCAGTTGACGATTAACCTTCATGGTATCGGGTTTCACACTGCGAAT 223

Рис. 3. Примеры секвенирования плазмидной ДНК содержащих *snc RNA-1* и *snc RNA-2*: А – 1 – сиквенс; 2 – сравнение (Alignment) секвенированного продукта *snc RNA-1* с геномной ДНК ВЯП *B. mori*. Б – 1 – сиквенс; 2 – сравнение (Alignment) секвенированного продукта *snc RNA-2*, с геномной ДНК ВЯП *B. mori*

ncbi.nlm.nih.gov/. Примеры выравнивания представлены на рис. 3 (А, 2 и Б, 2).

Проведение сравнения секвенированной последовательности *snc RNA-1* в Blast показало 100%-ю идентичность искомой последовательности с предсказанной последовательностью генома ВЯП *B. mori* штамм India (NC_001962.1). Кроме того, сравнение данного участка со штаммами ВЯП *B. mori* и другими вирусами ВЯП показало, что из 99 ВЯП, представленных в базе данных, 100%-ю идентичность имеют 44 различных штамма ВЯП *B. mori* с данным участком, 98% сходства с *snc RNA-1* имеют 7 штаммов различных изолятов ВЯП *B. mori* и очень высокую идентичность данного участка – от 84 до 98% имеют оставшиеся 48 вирусов ВЯП из представленных в базе данных.

Далее мы провели сравнение секвенированной последовательности *snc RNA-2* в Blast. Из 104 ВЯП с секвенированной последовательностью 100%-но идентичны 34 различных изолята ВЯП. *B. mori snc RNA-2* показала 100%-ю идентичность с взятой для биоинформативного анализа последовательностью генома ВЯП *B. mori* штамм India (NC_001962.1). Остальные изоляты и вирусы ВЯП также показывают высокую идентичность от 85 до 98%. Высокая идентичность участков геномной ДНК различных ВЯП может говорить о консервативности данного участка.

В результате секвенирования образцов ДНК, полученных нами из РНК полиэдров *B. mori*, было показано, что малые РНК – *snc RNA-1* и *snc RNA-2* – входят в состав полиэдров. Полученные результаты секвенирования имеют 100%-ю идентичность с последовательностями, предсказанными нами биоинформативными методами [8].

Штамм вируса Bombyx mori NPV strain India любезно предоставлен сотрудником Института зоологии АН РУ (г. Ташкент, Узбекистан) Ниязовой Наимой.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ МАЛИХ РНК У ПОЛІЕДРАХ ВІРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛІЕДРОЗУ *Bombyx mori*

Т. В. Ширіна, Г. В. Геращенко,
М. Т. Бобровська, В. І. Кашуба

Інститут молекулярної біології та
генетики НАН України, Київ;
e-mail: t.v.shirina@inbox.ru

Біоінформативними методами показано, що ділянки геному вірусу ядерного поліедрозу *Bombyx mori* кодують дві малі РНК – *snc RNA-1* та *snc RNA-2*, які можуть виконувати структурну функцію під час формування кристалів поліедрів. Метою роботи є встановлення нуклеотидної послідовності малих некодуючих РНК, які були передбачені біоінформативними методами, з поліедрів *B. mori*. У роботі використано полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), електрофорез в агарозному гелі, клонування продуктів ПЛР, секвенування.

Встановлено, що нуклеотидні послідовності *snc RNA-1* та *snc RNA-2*, які комплементарні ділянкам мРНК поліедрів, включаються в поліедри *B. mori*. Ці РНК 100%-но ідентичні послідовностям, передбаченим нами біоінформативними методами. Одержані результати підтверджують запропонований нами біоінформативний підхід до пошуку малих РНК, які закодовані у геномі *B. mori*.

Ключові слова: вірус ядерного поліедрозу, *Bombyx mori*, поліедри, малі некодуючі РНК, секвенування.

**IDENTIFICATION OF SMALL RNA
IN POLYHEDRA OF *Bombyx mori*
NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS**

*T. V. Shirina, G. V. Gerashchenko,
M. T. Bobrovskaja, V. I. Kashuba*

Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: t.v.shirina@inbox.ru

It has been shown by bioinformatic methods that regions of the *Bombyx mori* viral nuclear polyhedrosis genome encoded two small RNA - snc RNA-1 and snc RNA-2, which could perform a structural function in polyhedra crystals formation. The aim of this work was identification of the nucleotide sequence of small non-coding RNAs, predicted by bioinformatic methods in *B. mori* polyhedra. The following methods have been used: polymerase chain reaction, agarose gel electrophoresis, the cloning of PCR products, sequencing.

There were first determined nucleotide sequences of snc RNA-1 and snc RNA-2 of polyhedrin mRNA complementary regions which are included in *B. mori* polyhedra. These RNAs have 100% identity with bioinformatic predicted sequences. These results confirmed our bioinformatic approach to the search for small RNAs encoded in *B. mori* nuclear polyhedrosis virus genome.

Key words: nuclear polyhedrosis virus, *Bombyx mori*, polyhedrin, small non-coding RNA, sequencing.

1. Козлов Э. А., Согуляева В. М., Левитина Т. Л. и др. // Биохимия. – 1969. – **39**, № 4. – С. 679–684.
2. Тарасевич Л.М. Вирусы насекомых / Ред. Я. И. Раутенштейн. – М.: Наука, 1975. – 135 с.
3. Кок И. П., Скуратовская И. Н., Строковская Л. И. Молекулярные основы репродукции бакуловирусов / Ред. С. М. Гершензон. – К.: Наук. думка, 1980. – 174 с.
4. Shapiro M., Ignoffo C.M. // J. Invert. Pathol. – 1971. – **18**, N 1. – P. 154–155.
5. Padhi S. B., Chase T. // J. Invert. Pathol. – 1976. – **28**, N 1. – P. 137–142.
6. Ruvkun G. // Science. – 2001. – **294**, N 5543. – P. 797–799.
7. Ширина Т. В., Бобровская М. Т., Козлов Э. А. // Укр. біохім. журн. – 2010. – **82**, № 6. – С. 87–92.
8. Ширина Т. В., Бобровская М. Т., Козлов Э. А. // Укр. біохім. журн. – 2011. – **83**, № 5. – С. 59–66.
9. Ширина Т. В., Бобровская М. Т., Козлов Э. А. // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 1. – С. 60–66.
10. Ширина Т. В., Бобровская М. Т., Козлов Э. А. // Укр. біохім. журн. – 2011. – **83**, № 4. – С. 41–49.
11. Harrap K. A. // Virology. – 1972. – **50**, N 1. – P. 114–123.

Получено 30.05.2013