

И.В.Тучков, Я.М.Краснов, А.А.Горяев, Ж.В.Матвеева, А.В.Степанов, Н.В.Майоров, А.К.Никифоров

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ G ГЛИКОПРОТЕИНА РОССИЙСКОГО ФИКСИРОВАННОГО ШТАММА «МОСКВА 3253» ВИРУСА БЕШЕНСТВА

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Получен полный сиквенс G гликопротеина, региона ша-пси и H-концевого участка L гена штамма вируса бешенства «Москва 3253». Проведено сравнение аминокислотной последовательности белков штамма «Москва 3253» и других фиксированных штаммов вируса. Определена 98 % гомология ДНК со штаммом RV-97, тогда как гомология ДНК штамма PV (Pasteur virus) составила 91 %. Построено филогенетическое дерево родства изучаемого штамма и различных групп фиксированного вируса бешенства. Обнаружено что исследуемый штамм имеет большее генетическое родство со штаммами японской группы, чем со штаммом PV. Высказано предположение, что штамм PV не является производным вируса выделенного Пастером, а относится к американской группе штаммов.

Ключевые слова: вирус бешенства, филогенетический анализ, нуклеотидная последовательность, полимеразная цепная реакция, сиквенирование ДНК.

I.V.Tuchkov, Ya.M.Krasnov, A.A.Goryaev, Zh.V.Matveeva, A.V.Stepanov, N.V.Mayorov, A.K.Nikiforov

Nucleotide Sequence and Phylogenetic Analysis of Glycoprotein-G of the Russian Fixed Rabies Virus Strain "Moscow 3253"

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Fully sequenced have been glycoprotein-G, sha-psi region, as well as H-end site of the L-gene in the rabies virus strain "Moscow 3253". Compared are amino acid sequences of proteins of "Moscow 3253" strain and other fixed strains of the virus. Established is 98 % DNA homology with RV-97, and 91% homology with PV (Pasteur virus) strain. Constructed has been phylogenetic tree of the strain under study alongside with various groups of fixed rabies virus. It is revealed that "Moscow 3253" strain has closer genetic relations with Japanese group of strains, than with PV strain. Put forward is an assumption that PV strain does not derive from the virus isolated by Pasteur, but relates to the American group of strains.

Key words: rabies virus, phylogenetic analysis, nucleotide sequence, polymerase chain reaction, DNA sequencing.

Филогенетический анализ молекулярных данных является одним из подходов к изучению структуры и функции генетических макромолекул и их эволюционного преобразования. Основная цель филогенетического анализа – изучение порядка дивергенции последовательностей генов и аминокислот, а также сравнение эволюционных событий в родственных молекулах ДНК или РНК. Консервативность генов позволяет определять отдаленное родство между их представителями, давно разошедшимися в ходе эволюции.

Возбудитель бешенства относится к роду *Lissavirus*, семейства *Rhabdoviridae*. Геном вируса бешенства это несегментированная, антисмысловая, однонитевая РНК величиной 12000 нуклеотидов. Вирусная РНК кодирует пять основных белков, три из которых (L, Р и N) связаны с нуклеокапсидом, а два других (G и М) входят в состав липопротеиновой оболочки [5].

Несколько вирусных белков содержат антигенные и иммунодоминантные участки, хотя G белок считается основным иммуногеном и антигеном вируса бешенства [6]. Уличный вирус бешенства, выделенный Пастером в 1882 г., в дальнейшем был пассирован через мозг кролика путем субдурально-

го заражения. Штамм PV (Pasteur virus) официально получен в 1965 г. из Панамериканского зоонозного центра (Буэнос-Айрес, Аргентина) и, вероятно, является производным оригинального пастеровского вируса. Сведений о том, как штамм из США попал в Аргентину, нет. После 1965 г. в институте Пастера в Париже этот штамм прошел один пассаж на мозге кролика и был адаптирован к культуре клеток ВНК-21 [4].

Штаммы японской группы тоже берут свое начало от Пастеровского штамма, который был передан в Японию, вероятно, в 1915 г. [8]. После серии пассажей на мозге кролика и мозге морской свинки получен штамм Nishigahara. Производными этого штамма в результате адаптации к куриному эмбриону и культуре клеток являются штаммы RC_HL и NiCe [9].

Американская ветвь оригинального фиксированного вируса Пастера представлена штаммами PM (Pitman – Moore) и CVS (Challenge virus Standart): первый адаптирован к мозгу кролика и культуре клеток, второй – к мозгу мыши и культуре клеток [4].

Группа американских штаммов представлена штаммами Sad-B19, SAD-21, ERA, Vnukovo-32. Штамм-предшественник был выделен от бешеной собаки в штате Алабама (США) в 1935 г.

Вышеуказанные штаммы были фиксированы путем проведения пассажей через мозг мыши, куриный эмбрион и клетки почки сирийского хомячка [3].

Штамм Flury выделен в 1939 г. из мозга девочки, погибшей от бешенства. Через 40–50 пассажей получен штамм LEP Flury (Low embryo passages), а через 180 пассажей HEP Flury (High embryo passages) [4].

В 1886 г. Пастеровский штамм был передан в Россию [1]. Было проведено 3500 внутримозговых пассажей этого штамма на кроликах, и в настоящее время он используется под названием «Москва». В данном исследовании используется штамм «Москва» 3253-го пассажа.

Фиксированный штамм «Овечий» является производным штамма «Москва», полученным в результате 80 пассажей в мозговой ткани овец. С использованием методов культивирования в прививаемых клетках почки детеныша хомячка из штамма «Овечий», был получен фиксированный штамм «Щелково-51» [2]. В результате культивирования в клетках почки сайги штамма «Овечий» был селекционирован фиксированный вирус бешенства штамм РБ-71 [3].

После адаптации этого штамма к культуре клеток почки детеныша хомячка в Покрове получен штамм RV-97, который в 2007 г. был полностью сиквенирован А. Metlin и соавт. Следует отметить, что если геномы штаммов группы PV и американской группы в большинстве сиквенированы, то из российских штаммов полная нуклеотидная последовательность известна только для штамма RV-97 [7].

Материалы и методы

Штамм фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» получен из Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова (Москва).

Выделение суммарной РНК проводили, используя набор GeneJET RNA Purification Kit («Fermentas», Литва) в соответствии с инструкцией к набору.

Синтез первой цепи комплементарной ДНК на вирусной РНК проводили с использованием набора «RevertAid First strand cDNA Synthesis Kit» («Fermentas», Литва) и протокола для «random» праймеров. ПЦР проводили в термоциклере «Терцик» производства «ДНК-Технология» (Москва). В пробирку вносили 10 мкл кДНК разведенной 1:10 и 15 мкл реакционной смеси, содержащей по 1 мкл прямого и обратного праймеров; 2,5 мкл буфера для ПЦР; 2,5 мкл 8 мМ dNTP; 1 мкл 50 мМ MgCl₂; 0,2 мкл 5 ед/мкл Taq ДНК-полимеразы («Бионем» Россия); 6,8 мкл деионизованной воды. Продукты ПЦР очищали с помощью набора реактивов «Wizard™ PCR Preps DNA Purification Kit» (Promega, США). Сиквенирование проводили на генетическом анализаторе «SEQ-8000» с использованием стандартных протоколов пробоподготовки и программного обеспечения прибора.

Сборку и выравнивание последовательностей,

а также расчет генетических дистанций и филогенетическую реконструкцию по методу ближайшего связывания NJ осуществляли с помощью программы Vector NTI Advance 11.5.1. Кроме собственных данных, для филогенетического анализа были использованы последовательности гена G гликопротеина из GenBank других штаммов Rabies virus: Ni Ce, AB128149; Nishigahara, AB044824; RC-HL, AB009663; PV, M13215; SAD B19, M31046; SRV9, AF499686; ERA, EF206707; Hep-Flury, AB085828; Lep-Flury, DQ099524; PM1503, DQ099525; RV-97, EF542830. Филогенетическое дерево построено на основе данных штамма SHBRV-18, AY705373.

Результаты и обсуждение

Выделенную РНК использовали в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК методом обратной транскрипции с помощью обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей и случайных праймеров. Первая пара специфических праймеров была взята из литературных данных и ограничивала регион ша-пси (участок между G и L генами.) [4].

После получения первого сиквенса последовательность была верифицирована в программе BLAST. Определена 98 % гомология со штаммом RV-97, тогда как гомология со штаммом PV составила 91 %. В дальнейшем праймеры для сиквенирования подбирались уже на последовательность RV-97 с перекрытием участков.

После получения полного сиквенса G гликопротеина, региона ша-пси, и N-концевого участка L гена проведено сравнение аминокислотной последовательности штамма «Москва 3253» с последовательностями других известных фиксированных штаммов.

Выявлена аминокислотная замена пролина на аргинин в позиции 107, которая дает возможность отличить производственный штамм от других фиксированных штаммов вируса бешенства, в том числе и от штамма RV-97.

Построено филогенетическое дерево родства различных представителей фиксированного вируса бешенства. Сиквенс генома штамма SHBRV, выделенного от летучей мыши, лег в основу филогенетического дерева. Обнаружено, что исследуемый штамм имеет большее генетическое родство со штаммами японской группы, чем со штаммом PV.

Наши данные полностью согласуются с данными А. Metlin и соавт., предположившими, что маловероятно происхождение штамма RV-97, производного штамма «Москва», от штамма PV, полученного из Аргентины.

Мы считаем, что общим предком российских и японских штаммов фиксированного вируса бешенства является оригинальный пастеровский вирус, от которого они берут начало (российские штаммы с 1886 г., а японские – с 1915 г.). Штамм PV не является производным вируса, выделенного Пастером, а по филогенетическому анализу скорее относится к

группе, берущей начало от штамма, выделенного от собаки в Алабаме (США) в 1935 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гамалея Н.Ф., Мечников И.И., Тимирязев К.А. Пастер. Издательство академии наук СССР; 1946. 52 с.
2. Груздев К.Н., Недосеков В.В. Бешенство животных. М.: Аквариум; 2001. 303 с.
3. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина; 1978. 334 с.
4. Sacramento D., Badrane H., Bourhy H., Tordo N. Molecular epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains. *J. Gen. Virol.* 1992; 73:1149–58.
5. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Part II – The Negative Sense Single Stranded RNA Viruses. Elsevier Academic Press; 2005. P. 609–14.
6. Faber M., Faber M.L., Papaneri A., Bette M., Weihe E., Dietzschold B., Schnell M.J. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. *J. Virol.* 2005; 79:14141–8.
7. Metlin A., Paulin L., Suomalainen S., Neuvonen E., Rybakov S., Mikhailishin V., Huovilainen A. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97. *Virus Res.* 2008; 132(1–2):242–7.
8. Sakamoto S., Nakatake H., Tokiyoshi S., Yamamoto M., Kawai A., Smith. Studies on the antigenicity and nucleotide sequence of the rabies virus Nishigahara strain, a current seed strain used for dog vaccine production in Japan. *Virus Genes.* 1994; 8(1):35–46.
9. Wenqiang Jiao, Xiangping Yin, Zhiyong Li, Xi Lan, Xuerui Li, Xiaoting Tian, Baoyu Li, Bin Yang, Yun Zhang, Jixing Liu. Molecular characterization of China virus vaccine strain. *Virol. J.* 2011; 8:521

References

1. Gamaleya N.F., Mechnikov I.I., Timiryazev K.A. [Pasteur]. USSR

- Science Academy publishing house; 1946. 52 p.
2. Gruzdev K.N., Nedosekov V.V. [Rabies in Animals]. M.: Akvarium; 2001. 301 p.
3. Selimov M.A. [Rabies]. M.: Meditsina; 1978. 334 p.
4. Sacramento D., Badrane H., Bourhy H., Tordo N. Molecular epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains. *J. Gen. Virol.* 1992; 73:1149–58.
5. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Part II – The Negative Sense Single Stranded RNA Viruses. Elsevier Academic Press; 2005. P. 609–14.
6. Faber M., Faber M.L., Papaneri A., Bette M., Weihe E., Dietzschold B., Schnell M.J. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. *J. Virol.* 2005; 79:14141–8.
7. Metlin A., Paulin L., Suomalainen S., Neuvonen E., Rybakov S., Mikhailishin V., Huovilainen A. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97. *Virus Res.* 2008; 132(1–2):242–7.
8. Sakamoto S., Nakatake H., Tokiyoshi S., Yamamoto M., Kawai A., Smith. Studies on the antigenicity and nucleotide sequence of the rabies virus Nishigahara strain, a current seed strain used for dog vaccine production in Japan. *Virus Genes.* 1994; 8(1):35–46.
9. Wenqiang Jiao, Xiangping Yin, Zhiyong Li, Xi Lan, Xuerui Li, Xiaoting Tian, Baoyu Li, Bin Yang, Yun Zhang, Jixing Liu. Molecular characterization of China virus vaccine strain. *Virol. J.* 2011; 8:521

Authors:

Tuchkov I.V., Krasnov Ya.M., Goryaev A.A., Matveeva Zh.V., Stepanov A.V., Mayorov N.V., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Тучков И.В., Краснов Я.М., Горяев А.А., Матвеева Ж.В., Степанов А.В., Майоров Н.В., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 16.09.13.