

УДК 578.832

М.С. Алексюк

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Республика Казахстан, г. Алматы
E-mail: Madina.a06@gmail.com**Сравнительный анализ методов концентрации водных образцов,
содержащих вирусный материал**

Основной характеристикой любой экосистемы является взаимоотношение ее составляющих: биотопа и биоценоза, поэтому при любом изменении одной из них неминуемо изменение другой. В качестве индикаторов состояния экосистем можно использовать биометрические показатели, которые позволяют проводить раннее выявление неблагоприятных экологических воздействий и принимать своевременные меры по ограничению антропогенных нагрузок на экосистемы задолго до возникновения критических, необратимых ситуаций. В свою очередь, при изучении экологического состояния водных экосистем одной из основных задач является концентрирование биологического материала из образцов для получения биометрических показателей.

Целью настоящих исследований являлось сравнительное изучение 5-ти основных методов концентрации биологического материала из водных образцов для выделения и дальнейшего использования вирусных нуклеиновых кислот: центрифугирование, мембранная фильтрация, осаждение спиртом, высаливание солями, и обезвоживание полиэтиленгликолем.

В результате проведенных исследований было установлено, что разный уровень содержания вирусных частиц может потребовать разные варианты концентрирования образца.

Ключевые слова: концентрирование, вирусы, нуклеиновые кислоты, полимеразная цепная реакция, инфекционная доза.

M.S. Alexyuk

Comparative analysis of methods for the concentration of aqueous samples containing viral material

The main characteristic of any ecosystem is the relationship of its components : the biotope and biocenosis, so any change in one of them will inevitably change the other. As indicators of ecosystem can use biometric indicators that allow early detection of adverse environmental impacts and take timely measures to limit anthropogenic pressures on ecosystems long before the emergence of critical , irreversible situation . In turn, the study of the ecological status of aquatic ecosystems one of the main problems is the concentration of samples of biological material for obtaining biometric indicators.

The aim of the present study is a comparative study of 5 basic methods of concentration of biological material from water samples for further use and viral nucleic acids: centrifugation, membrane filtration, ethanol precipitation , salting out salts , and polyethylene glycol dehydration .

The studies found that the different levels of viral particles of the different embodiments may require concentration of the sample.

Keywords: concentration , viruses , nucleic acid, polymerase chain reaction, the infectious dose.

М.С. Алексюк

Вирустық материалды асырайтын сулы үлгінің шоғырлану әдісінің салыстырмалы анализі

Негізгі түсініктеме бойынша әрбір экожүйенің өзара қатынастарынан оның құрамында: биотоп және биоценоз болғандықтан, әрбір өзгерістердерінде солардың ішіндегі сол өзгерістері басқаша. Экожүйенің жағдайына индикатордың сапасына байланысты биометриялық көрсеткішті пайдалануға болады, көрсеткіштерді қолайсыз экологиялық әсерлер және өз уақытында өлшемнің шектеуін антропогенді күштермен экожүйенің қиын жағдайында пайда болады. Өз уақытында экологияның жағдайын зерттеу уақытында су экожүйесінің соның ішіндегі негізгі тапсырманың ішінде биологиялық шоғырландыру материалдар және биометриялық көрсеткіштер болып табылады.

Негізгі көрсеткіштердің мақсаты салыстырмалы зерттегенде 5-негізгі методикасы су үлгісін пайдалану және оларды бөліп алу биологиялық шоғырландыру материалдар келесі вирустық нуклеинді қышқылдар: центрифугирлеу, мембранды, сүзгі, спирт тұнбасы тұзды себу арқылы және полиэтиленгликолмен.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесі бекітілген, әртүрлі деңгейде вирустың бөлшектердің әртүрлі варианттардың шоғырландыру үлгілері болады.

Түйін сөздер: шоғырландыру, вирустар, нуклеинді қышқылдар, полимерлі жабысу реакциясы, індет мөлшері.

Конец XX – начало XXI веков вновь привлек внимание экологов к царству вирусов. В первую очередь, это было обусловлено тем, что вирусы являются одной из наиболее значимых в количественном соотношении частей любого биотопа. Численность вирусов в морской воде в 5–25 раз превышает численность микроорганизмов (обычно концентрация вирусов в эвфотической зоне, т.е. у поверхности, составляет 10 млрд. в 1 л воды). При этом вирусы являются не столько причиной инфекционных заболеваний, сколько регуляторами популяций микроорганизмов, играя существенную роль в сезонном изменении численности бактерий почвенных и водных экосистем. В свою очередь бактерии в водных экосистемах выполняют задачи, как продуцентов первого порядка, так и редуцентов, поэтому их численность кардинальным образом влияет на всю экосистему. Таким образом, вирусы являются важнейшей и неотъемлемой частью экосистем, и изучение экологии вирусов дает возможность вовремя диагностировать и прогнозировать возможные изменения экологического баланса, контролировать вспышки вирусных инфекций обитателей водных экосистем, а также методами вирусологии определять степень микробиологического загрязнения исследуемых водоемов [1]. Количественная оценка вирусной популяции водных экосистем стала возможной с появлением технологии метода цепной полимеразной реакции в реальном времени. Лимитирующим фактором использования этих методов для характеристики вирусных составляющих биотопов является необходимость этапа концентрации значительного объема воды, т.к. количество вирусов в водных образцах составляет от 25 вирионов в миллилитре образца, что недостаточно для выделения вирусных нуклеиновых кислот и дальнейшего изучения водного образца [2].

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение возможности использования 5-ти основных методов концентрации биологического материала из водных образцов для выделения и дальнейшего использования вирусных нуклеиновых кислот: центрифугирование, мембранная фильтрация, осаждение спиртом, высаливание солями, и обезвоживание полиэтиленгликолем.

Материалы и методы

В качестве вирусосодержащего образца использовали физиологический раствор, содер-

жащий 1 и 100 000 инфекционных доз вируса гриппа А/цыпленок/FPV/Росток/34/1 (H7N1) в 0,1 мл [3].

Концентрацию 100 мл образцов, содержащих разное количество вирусного материала, проводили стандартными методами ультрацентрифугирования вирусосодержащих материалов, удалением избытка воды полиэтиленгликолем, высаливанием с помощью сульфата аммония, осаждением спиртом и использованием полупроницаемых мембран, позволяющих концентрировать образцы с молекулярной массой более 100кД [4].

Количественную оценку концентрированных вирусосодержащих препаратов проводили с помощью метода ЦПР в реальном времени при определении количества фрагмента гена матричного белка вируса гриппа.

Суммарную РНК выделяли из 200 мкл вирусосодержащей аллантоисной жидкости с помощью набора для экстракции РНК Rneasy Mini Kit («QIAGEN, GmbH», Германия) согласно методическому руководству с небольшими модификациями.

Обратную транскрипцию осуществляли с помощью M-MLV («Promega», США) в 5 мкл реакционной смеси (2,7 мкл РНК (50 нг), 0,84 мкл воды, 1 мкл 5x буфера для обратной транскриптазы («Promega», США), 0,19 мкл 2 mM смеси dNTPs, 0,25 мкл 20 pmol праймера Uni-12 (5'-gca aaa gca gg-3') и 0,125 мкл M-MLV(1U/мкл). Реакцию проводили при 37 °C в течение 60 мин.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 20 мкл реакционной смеси (4 мкл ДНК матрицы, 8 мкл SybrGreen, по 1 мкл 20 pmol прямого и обратного праймеров, вода). 45 циклов ПЦР на термоциклере «PicoReal» проводили при следующих режимах: 94 °C – 1 мин, 48 °C – 1 мин, 72 °C – 3 мин.

Динамику накопления ампликонов изучали при использовании фрагмента гена матричного белка (праймеры M+5 5'-aag cag gta gat att gaa ag-3' и M-1027 5'-agt aga aac aag gta gt-3').

Математическая обработка результатов. Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [5].

Результаты и обсуждение

Количественная оценка содержания вирусного материала в водных образцах имеет огромное значение не только для эпидемиологической, но и экологической характеристики

водных экосистем. Поэтому концентрация водных образцов, содержащих вирусный материал, является лимитирующим этапом анализа содержания вируса в образце. Для сравнительного анализа разных методов концентрации было использовано 5 методов концентрации водных образцов, содержащих 10^5 и 1 инфекционную дозу в миллилитре. Сравнительный анализ наличия генетического материала методом ПЦР в реальном времени образцов, содержащих разное количество инфекционных доз вируса показал, что при обнаружении вируса методом ЦПР в реальном времени кратность разведения вирусосодержащего материала не подчиняется строгому закону пропорциональности. Так, если для достоверного определения вируса в образце, содержащем 10^5 инфекционных доз, было достаточным 25 циклов репликации, то для образца содержащего 1 инфекционную дозу количество циклов составляло 35, что составляло величину в 100 раз меньшую, чем в случае строго пропорциональной зависимости (рисунок 1).

Кроме того, было показано, что эффективность различных методов концентрации вирусосодержащего материала в значительной степени зависела от количества инфекционного образца в исследуемом материале.

Показано, что при осаждении вирусного материала этанолом в пробах содержащих 1 и 10^5 степени инфекционных доз количество циклов для определения исследуемого гена составило 38 и 27 циклов соответственно (рис. 2 А, Б).

Количество циклов для синтеза гена матричного белка в образцах осажденных сернокислым аммонием было равно 41 для пробы с содержанием 1 инфекционной дозы и 27 для

пробы с содержанием 10^5 инфекционных доз (рис. 2 А, Б).

При определении числа копий гена матричного белка методом РТ ПЦР, в образцах сконцентрированных фильтрацией через полупроницаемую мембрану было показано, что в пробах содержащих 1 и 10^5 инфекционных доз вируса число циклов полимеразной реакции для определения исследуемой нуклеиновой кислоты равно 40 и 32 циклам соответственно (рис 2 А, Б).

РТ ПЦР вирусосодержащего материала сконцентрированного методом ультрацентрифугирования показал, что при содержании 1 инфекционной дозы вируса требовалось 34 цикла детекции исследуемого гена, а при содержании 10^5 инфекционных доз – 28 циклов (рис. 2 А, Б).

Количество циклов для обнаружения гена матричного белка в вирусосодержащих образцах полученных методом осаждения полиэтиленгликолем 6000 составило 35 циклов для пробы с исходным содержанием 1 инфекционных доз вируса и 32 для проб содержащих 10^5 инфекционных доз вируса (рис. 2 А, Б).

При сравнительном изучении различных методов концентрирования вирусосодержащих материалов установлено, что не все методы концентрирования можно использовать при работе с различными вирусосодержащими материалами. Так, для проб с содержанием 10^5 инфекционных доз вируса гриппа эффективными методами концентрации вирусосодержащего материала являются методы осаждения этанолом, высаливания и ультрацентрифугирования, а для проб с содержанием 1 инфекционной дозы целесообразными являются методы ультрацентрифугирования и концентрации ПЭГ.



Рисунок 1 – Результаты ПЦР контрольных образцов с различным содержанием инфекционных доз вируса

Примечание: по оси абсцисс – показание спектрофотометра, по оси ординат – номер цикла.

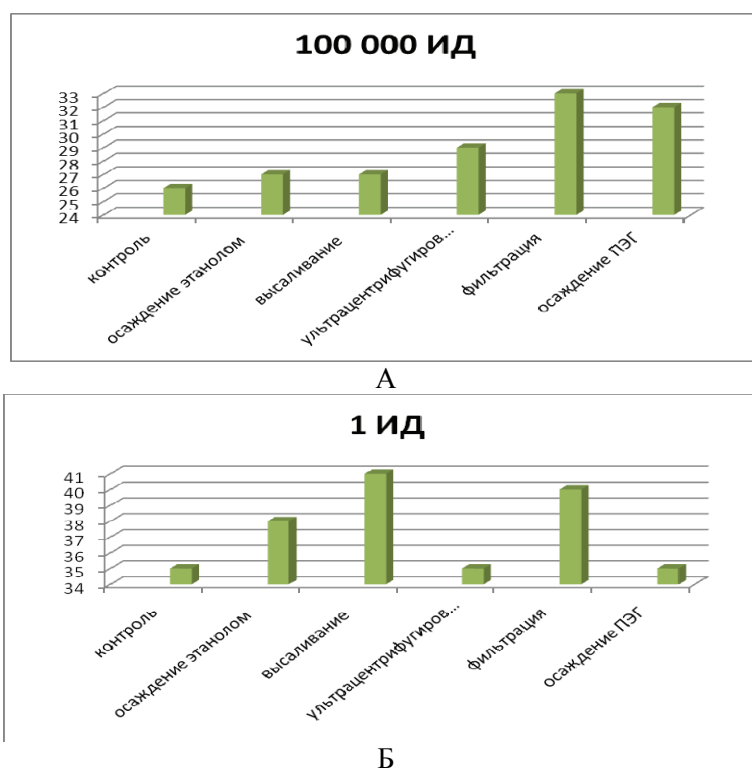


Рисунок 2 – Сравнительное изучение различных методов концентрации вируса

Примечание: А – пробы, содержащие 10^5 инфекционных доз, Б – пробы, содержащие 1 инфекционную дозу.

Таким образом, метод ПЦР в режиме реального времени позволяет эффективно выявлять генетический вирусный материал в широком диапазоне концентраций. Однако при

использовании водных образцов следует помнить, что разный уровень содержания вирусных частиц может потребовать разные варианты концентрирования образца.

Литература

- 1 Яковленко М. Вирусы – новый фактор в экологии моря // Биология. – №9. – 2000.
- 2 Veeraraghavan N., Sreevalsan M. Evaluation of Some Methods of Concentration and Purification of Influenza Virus Bull. World Health Organization. – 1961. – 24. – 695-702.
- 3 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // Amer.J. Hyg. – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
- 4 A Comparison of Methods for Counting Viruses in Aquatic Systems Yvan Bettarel, Christian Amblard, Henri Laveran Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – P. 2283–2289.
- 5 Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975. – 296 с.

References

- 1 Jakovlenko M. Virussy – novyj faktor v jekologii morja // Biologija. – №9. – 2000.
- 2 Veeraraghavan N., Sreevalsan M. Evaluation of Some Methods of Concentration and Purification of Influenza Virus Bull. World Health Organization. 1961, 24, 695-702.
- 3 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // Amer.J. Hyg. – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
- 4 A Comparison of Methods for Counting Viruses in Aquatic Systems Yvan Bettarel, Christian Amblard, Henri Laveran Applied and Environmental Microbiology, 2000. – P. 2283–2289.
- 5 Urbah V.Ju. Statisticheskij analiz v biologicheskikh i medicinskih issledovanijah. – M.: Medicina.- 1975. – 296 s.