

ОСОБЕННОСТИ ПОДБОРА ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

В.А. Лубова, А.Л. Шутикова, М.Ю. Щелканов

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора,
Владивосток, Россия

PECULIARITIES OF PRIMERS SELECTION FOR TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS SEQUENCING

V.A. Lubova, A.L. Shutikova, M.Yu. Shchelkanov

G.P. Somov Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Federal service for surveillance on consumers rights protection and human wellbeing (Rospotrebnadzor), Vladivostok, Russia

Клещевой энцефалит (КЭ), этиологически связанный с вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) (Amarillovirales: Flaviviridae, *Flavivirus*) – тяжелая природно-очаговая вирусная инфекция, передающаяся трансмиссивным путем при укусе иксодовых клещей (Parasitiformes: Ixodidae) и алиментарным путем при употреблении зараженных пищевых продуктов; основной пик заболеваемости КЭ приходится на весенне-летний период [1-4]. ВКЭ широко встречается на территории Евразии от Атлантического до Тихого океана в лесных, лесостепных и экстразональных экосистемах [4-7]. Ареал вируса, в основном, совпадает с ареалами его основных переносчиков – иксодовых клещей *Ixodes persulcatus* и *I. ricinus* [1, 2, 8-11].

ВКЭ представляет собой икосаэдрический капсид, окруженный сферической липопротеиновой оболочкой (45-60 нм). Капсид включает односегментную РНК положительной полярности. Основными структурными белками вириона являются С, Е, М, кодируемые последовательностями на 5'-конце генома. На 3'-конце расположены неструктурные белки NS1-NS5, заканчивающиеся стоп-кодоном UAA. Для структурных белков (и, соответственно – для 5'-конца генома) характерна высокая вариабельность, что определяет фенотипические и генотипические свойства генома ВКЭ [2-4, 12].

Цель исследования – осуществить подбор видоспецифичных праймеров для секвенирования полного генома дальневосточных штаммов ВКЭ.

Для проверки работоспособности системы праймеров был выбран штамм ВКЭ/Primorye-124 из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора [10], изолированный в 1983 г. из клеща *I. persulcatus*. В работе использовали 10 % мозговую суспензию интрацеребрально-инокулированных беспородных мышей-сосунков. Последующую полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с «горячим стартом» и подготовку к ней проводили с использованием коммерческих наборов «РИБО-преп», «Реверта-Л» (ЦНИИ эпидемиологии, РФ), БиоМастер HS-Taq ПЦР (2×) (Биолабмикс, РФ). Электрофорез проводили в 1,5 % агарозном геле. Последующее секвенирование полных геномов штаммов ВКЭ проводили методом Сэнгера на капиллярном секвенаторе Nanog 1616 (Nanjing Superyears Gene Technology, КНР). Для анализа полученных хроматограмм и проверки видоспецифичности полученных олигонуклеотидов использовали программу Mega v.7.0 (PSU, США) и систему встроенных в неё алгоритмов. Последовательности референс-штаммов для подбора праймеров были взяты из международной базы генетических данных GenBank.

После подбора необходимых референс-последовательностей и их выравнивания, референс-штаммы были условно разделены на участки по 600-650 пар нуклеотидов. Подбор праймеров производили вручную без использования каких-либо дополнительных программ, но с учетом всех требований к конструированию видоспецифичных олигонуклеотидов. Для полногеномного секвенирования ВКЭ нами были выбраны 20 пар видоспецифичных праймеров. Далее была произведена проверка полученных пар праймеров на образование возможных вторичных шпильчатых структур, димеров, расчёт доли GC-оснований, оценка температуры плавления каждого олигонуклеотида и его молекулярный вес. В процессе экспериментальной верификации нами была подобрана оптимальная температура отжига олигонуклеотидов, необходимые концентрации кДНК и праймеров.

Оценка длины полученных ПЦР-продуктов осуществлялась путём измерения их подвижности в агарозном геле с визуализацией под УФ-трансиллюминатором. Было показано успешное прохождение ПЦР, свидетельствующее об отжиге подобранных праймеров.

Для проверки видоспецифичности полученных последовательностей и ПЦР-продуктов было проведено секвенирование штамма Primorye-124 по методу Сэнгера. В результате мы получили хроматограммы с хорошим уровнем сигнала, превосходящими количество шума, ровными одиночными пиками, равноудаленными друг от друга.

Результаты экспериментов свидетельствуют об успешном отжиге праймеров и показывают их специфичность к геному ВКЭ. Подобранные нами синтетические олигонуклеотидные последовательности могут быть использованы в качестве праймеров для полногеномного секвенирования ВКЭ.

Литература

1. Медицинская вирусология. Ред.: ДК Львов. М.: МИА, 2008. 655 с.
2. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Ред.: ДК Львов. М.: МИА, 2013. 1200 с.
3. Злобин ВИ, Беликов СИ, Джигоев ЮП и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита: монография. Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН, 2003. 271 с.
4. Lvov DK, Shchelkanov MYu, Alkhovsky SV, Deryabin PG. Zoonotic viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology. Academic Press, 2015. 452 p.
5. Кучерук ВВ, Иванова ЛМ, Неронов ВМ. Клещевой энцефалит. В кн.: География природно-очаговых болезней в связи с задачами их профилактики. М, 1969. 171-217.
6. Львов ДК, Дерябин ПГ, Аристова ВА и др. Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации. М.: Изд-во НПЦ ТМГ МЗ РФ, 2001. 192 с.
7. Щелканов МЮ, Ананьев ВЮ, Львов ДН и др. Комплексный эколого-вирусологический мониторинг на территории Приморского края (2003-2006). Вопросы вирусологии. 2007;52(5):37-48.
8. Щелканов МЮ, Громашевский ВЛ, Львов ДК Роль эколого-вирусологического районирования в прогнозировании влияния климатических изменений на ареалы арбовирусов. Вестник РАМН. 2006;(2):22-25.
9. Щелканов МЮ, Аристова ВА, Чумаков ВМ и др. Историография термина «природный очаг». В сб.: Новые и возвращающиеся инфекции в системе биобезопасности Российской Федерации. Учебно-методическое пособие. М.: Изд-во Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, 2014. 21-32.
10. Запорожец ТС, Беседнова НН, Калинин АВ и др. 80 лет на страже биологической безопасности у восточных рубежей России. Здоровье населения и среда обитания. 2021;(5):5-15.
11. Щелканов МЮ, Леонова ГН, Галкина ИВ, Андрюков БГ. У истоков концепции природной очаговости. Здоровье населения и среда обитания. 2021;(5):16-25.
12. Плетнев АГ, Ямщиков ВФ, Блинов ВМ. Нуклеотидная последовательность генома и полная аминокислотная последовательность полипротеина вируса клещевого энцефалита. Биоорганическая химия. 1989;15(11):1504-1521.