



УДК 57.083.24;578.53

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2 ПО КОНСЕРВАТИВНОМУ УЧАСТКУ E-ГЕНА

© 2023 г. С. А. Лапа*[#], А. А. Шингарева*, Е. Б. Файзулов**[#], Ю. И. Аммур**[#],
В. Е. Шершов*, А. В. Чудинов*

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

**НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Россия, 115088 Москва, ул. 1-я Дубровская, 15

Поступила в редакцию 01.11.2022 г.

После доработки 13.12.2022 г.

Принята к публикации 16.12.2022 г.

Появление мутаций в генах, кодирующих поверхностные белки коронавируса нового типа SARS-CoV-2, при его циркуляции в популяции хозяина затрудняет применение моноклональных антител для видовой идентификации данного вируса. В таких случаях выбор консервативных генетических мишеней позволяет осуществлять идентификацию молекулярно-биологическими методами. В настоящей работе проведено тестирование разработанных ранее праймеров, специфичных к фрагменту E-гена, для выявления коронавируса нового типа на шести изолятах, принадлежащих различным генетическим вариантам SARS-CoV-2 (исходный уханьский геновариант, дельта и омикрон). Выбор консервативного участка E-гена (E gene, кодирующий малый трансмембранный белок E) в качестве мишени для обратной транскрипции с последующей амплификацией (ОТ-ПЦР) позволил детектировать коронавирус SARS-CoV-2 вне зависимости от его генетических вариантов, характеризующихся антигенной разнородностью по N- и S-белкам. Показана возможность видовой определения различных вариантов возбудителя COVID-19, циркулирующих в России, как в общем реакционном объеме (в пробирке), так и на биологических микрочипах (гелевых и щеточных).

Ключевые слова: ОТ-ПЦР, SARS-CoV-2, видовая идентификация, иммобилизованные праймеры, биологические микрочипы

DOI: 10.31857/S0132342323040358, EDN: ODHDFE

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирус нового типа SARS-CoV-2, подобно другим РНК-содержащим вирусам, обладает высокой генетической пластичностью и образует множество новых серотипов в результате воздействия внешних факторов (циркуляция в популяции хозяина, смена хозяина, селекционное воздействие иммунной системы и лекарственной терапии) [1]. Изменение эпитопов в структурных белках (в случае коронавируса это, в первую очередь, S- и N-белки [2]) затрудняет идентификацию вируса иммунологическими методами. Предположительно, белки, в меньшей степени входящие в прямой контакт с иммунной системой хозяина, мутируют менее интенсивно, но при этом их ИФА-детекция затруднена по причине меньшей доступности для антител. Детекция

генетических последовательностей, соответствующих консервативным антигенам, в данном случае выступает методом выбора для создания надежных систем молекулярной диагностики.

Ранее в процессе разработки системы идентификации бактериальных и вирусных агентов, вызывающих пневмонию [3], для идентификации коронавируса SARS-CoV-2 нами был выбран E-ген, кодирующий трансмембранный белок E, играющий важную роль в патогенности вируса и передаче сигналов при попадании в клетку. Консервативный участок белка E, мотив β -coil- β СТ-области, принимает участие в фолдинге белка E в комплексе Гольджи. Вероятно, относительная консервативность белка E связана с резким ослаблением вируса при возникновении мутаций, снижающих его сродство к пальмитолитическому белку [4].

В настоящей работе проведено тестирование праймеров, видоспецифичных к коронавирусу SARS-CoV-2, на шести изолятах, относящихся к различным генетическим вариантам – исходному уханьскому штамму Wuhan-Hu-1, а также линиям B.1.1.529 (омикрон) и B.1.617.2 (дельта). Цель насто-

Сокращения: COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 года; SARS-CoV-2 – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с полимеразной цепной реакцией.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-00; эл. почта: lap@biochip.ru).

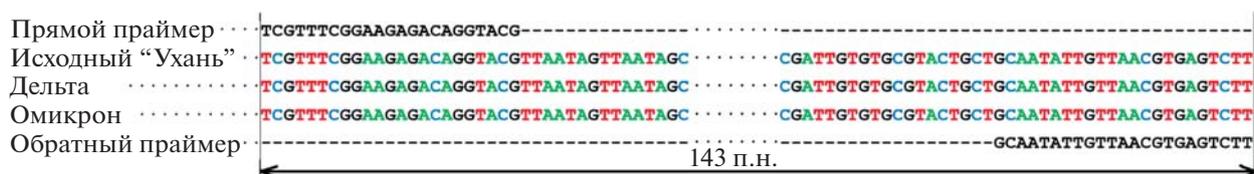


Рис. 1. Выравнивание последовательностей фрагмента *E*-гена (Envelope protein gene) различных генетических линий SARS-CoV-2.

ящего исследования заключалась не в дифференциации различных генетических линий SARS-CoV-2, а в проверке надежности идентификации данного вируса на уровне вида в мультиплексной системе анализа возбудителей клинически сходных респираторных заболеваний.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами была создана диагностическая система, основанная на мультиплексной ОТ-ПЦР с применением специально сконструированных видоспецифичных праймеров [3]. Система предназначена для идентификации шести бактериальных и двух вирусных возбудителей. В качестве вирусных возбудителей выбраны актуальные вирусы гриппа А и В (вызывают сезонные ОРВИ), а также коронавирус нового типа SARS-CoV-2. При конструировании праймеров для идентификации вирусных возбудителей были выбраны консервативные генетические мишени, менее подверженные влиянию внешних факторов, определяющих генетическую вариабельность этих вирусов (в случае коронавируса – *E*-ген).

Мониторинг новых генетических вариантов SARS-CoV-2 (>50 последовательностей по базе данных GenBank) показал полное теоретическое совпадение последовательностей праймеров и выбранной генетической мишени. Результаты выравнивания последовательностей фрагмента

E-гена приведены на рис. 1. В качестве примера приведено только по одной последовательности для каждой линии.

В работе проанализировано шесть образцов коронавируса SARS-CoV-2 (табл. 1). Представлены основные выделенные штаммы вариантов, вызывающих в настоящее время вспышки заболевания COVID-19 в России и в мире, а также относящихся к “вариантам, вызывающим беспокойство” (“variants of concern”), согласно классификации ВОЗ.

Исследована специфичность праймеров при концентрациях РНК в исследуемом образце в интервале 10^2 – 10^6 копий/мкл. Кроме того, использованы бактериальные ДНК шести возбудителей пневмонии (всего 30 штаммов), а также РНК вирусов гриппа А и В (три образца). Ложноположительных результатов при проверке специфичности праймеров не наблюдали (данные не приведены).

На рис. 2 показан электрофоретический анализ продуктов ОТ-ПЦР для указанных в табл. 1 штаммов коронавируса, а также сигналы с соответствующих праймеров, иммобилизованных на двух вариантах биологических микрочипов (гелевых и щеточных). Наблюдали специфические результаты ОТ-ПЦР для всех генетических линий, изучаемых в эксперименте (рис. 2а). Ложноположительных результатов при использовании в ка-

Таблица 1. Образцы коронавируса SARS-CoV-2, использованные в работе

№	Штамм	Генетическая линия	Пассажный уровень	Титр вируса**, lgТЦД ₅₀ /мл
0*	–	Уханьский вариант	–	–
1	“Dubrovka”	Филогенетически близкий к уханьскому варианту	17	7.50
2	“Proletarskaya”	Дельта	3	5.75
3	“Podolsk”	Дельта	9	6.10
4	“Otradnoe”	Омикрон	6	4.90
5	“LIA”	Омикрон	5	5.90
6	“Altufjevo”	Омикрон	5	5.70

* Так называемый “нулевой” образец, использованный при разработке системы [3].

** Титр вируса определяли методом предельных разведений в чувствительной культуре клеток Vero [5].

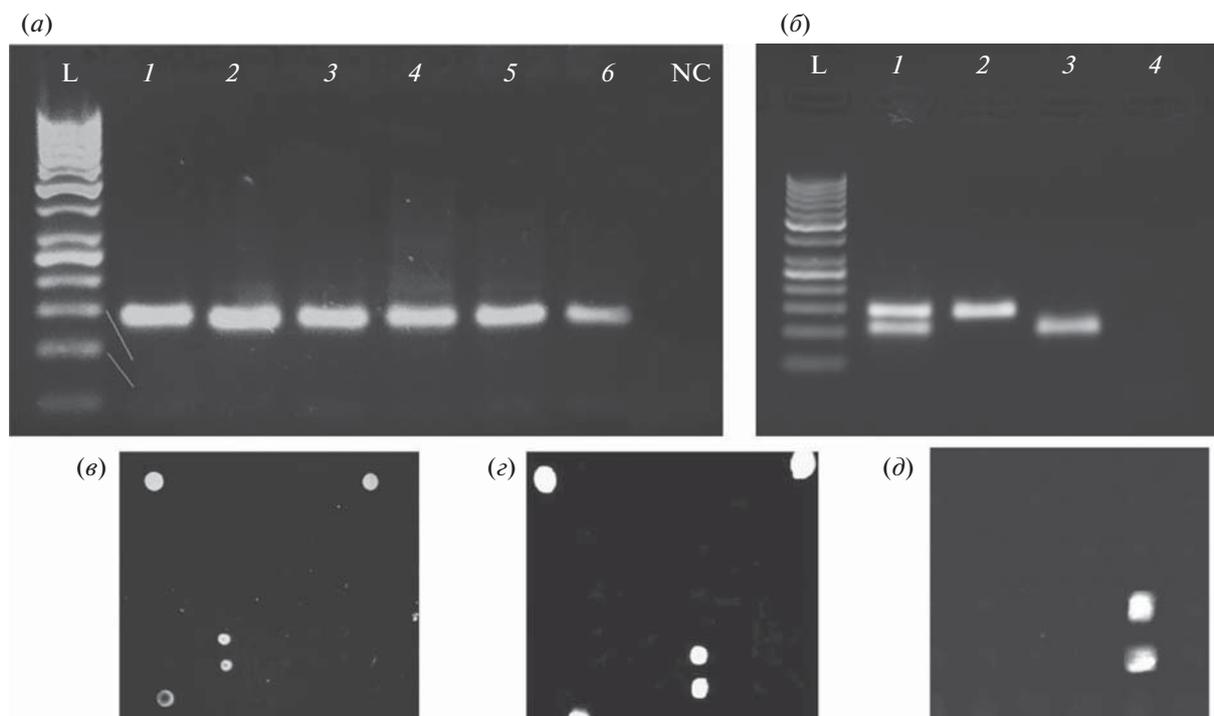


Рис. 2. (а) – Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента *E*-гена образцов коронавируса SARS-CoV-2 после ОТ-ПЦР в общем объеме (в пробирке). Концентрация вирусной РНК в образце – 10^3 ед./мкл; 4%-ный агарозный гель, окрашенный бромистым этидием. Обозначения: L – маркер длин продуктов GeneRuler 50 (Thermo Scientific, США), 1 – штамм “Dubrovka”, 2 – штамм “Proletarskaya”, 3 – штамм “Podolsk”, 4 – штамм “Otradnoe”, 5 – штамм “LIA”, 6 – штамм “Altufjevo”, NC – отрицательный контроль; (б) – электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента *E*-гена коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и В с применением мультиплексной ОТ-ПЦР: L – маркер длин продуктов ДНК GeneRuler 50 bp (Thermo Scientific, США), 1 – модельный образец, содержащий SARS-CoV-2 и вирус гриппа А, 2 – клинический изолят SARS-CoV-2, 3 – клинический изолят вируса гриппа А, 4 – клинический изолят вируса гриппа В (в качестве нецелевой мишени для проверки специфичности праймеров); (в) – результат видового определения SARS-CoV-2 на гидрогелевом биочипе; (г) – результат видового определения вируса гриппа А на гидрогелевом биочипе; (д) – результат видового определения SARS-CoV-2 на щеточном биочипе, фрагмент (во всех случаях ячейки со специфическими зондами дублированы). Сигналы, наблюдаемые на чипе, исходят только от ячеек со специфичными праймерами.

честве образцов бактериальных ДНК, а также РНК вирусов гриппа не зарегистрировано (на рис. 2б представлены данные только для образцов вирусов гриппа). На биочипах также наблюдали специфическую картину идентификации SARS-CoV-2. Для интерпретации результата анализа использовали алгоритм отсечки фоновых сигналов, описанный в работе Sorokin et al. [6], однако даже при визуальном определении результат интерпретировался однозначно, т.к. сигнал нецелевых ячеек был практически неотличим от сигнала фона (рис. 2в–2д).

Таким образом, сконструированные праймеры для ОТ-ПЦР способны идентифицировать представителей основных генетических линий коронавируса SARS-CoV-2, циркулирующих в России, – как в формате реакционной пробирки, так и в составе комплексной системы на биологическом микрочипе.

Следует отметить, что описаны точечные мутации *E*-гена, которые могут приводить к сниже-

нию эффективности тест-систем, основанных на детекции этого гена, хотя и с крайне низкой вероятностью (0.09%) [7]. Фирма Roshe, выступающая разработчиком исследованной в работе Artesi et al. [7] тест-системы cobas® SARS-CoV-2 test, не раскрывает последовательности своих праймеров, что осложняет выявление потенциальных проблем, связанных с их недостаточной специфичностью к новым мутантным вариантам вируса. Данная работа содержит открытые последовательности праймеров, что может облегчить сравнительный анализ различных тест-систем и оптимизировать диагностику коронавирусной инфекции в России.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы. Лизаты образцов SARS-CoV-2 (табл. 1) получали смешиванием вирусосодержащей культуральной жидкости с лизирующим буфером согласно инструкции (набор для выделения РНК

МАГНО-Сорб; AmpliSens, Россия). Инактивацию коронавируса SARS-CoV-2 оценивали по наличию или отсутствию цитопатического эффекта на чувствительной культуре клеток Vero. Вирусы гриппа А (штамм А/Panama/2007/99 H3N2, штамм А/Wisconsin/67/05 H3N2) и В (штамм В/Leningrad/179/86) получены из Коллекции микроорганизмов III и IV групп патогенности НИИВС им. И.И. Мечникова. Вирусную геномную РНК выделяли, как описано ранее [3]. Принадлежность каждого штамма к генетической линии ранее установлена секвенированием [5].

Бактериальные ДНК были выделены и деконтаминированы на базе ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболensk, Россия), как описано ранее [3].

Праймеры. Множественное выравнивание последовательностей *E*-гена проводили с помощью алгоритма ClustalW (www.clustal.org). Конструирование праймеров осуществляли с использованием сетевого ресурса www.idtdna.com, анализ специфичности (>100 последовательностей, находящихся в свободном доступе) проводили с помощью алгоритма BLAST (NIH, США) и с применением базы данных GISAID (<https://gisaid.org/>). Нуклеотидные последовательности праймеров, видоспецифичных к коронавирусу SARS-CoV-2: прямой 5'-TCGTTTCG-GAAGAGACAGGTACG-3' (23 нт) и обратный 5'-AAGACTCACGTTAACAATATTGC-3' (23 нт).

Твердофазный синтез олигонуклеотидов осуществляли с помощью автоматического синтезатора ABI 394 DNA/RNA (Applied Biosystems, США) по стандартному регламенту, очистку производили на колонке BDS Hypersil C18 (Thermo, США).

ОТ-ПЦР в растворе. Реакцию осуществляли с использованием обратной транскриптазы MMLV (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) и Hot Start Taq-полимеразы (Thermo Scientific, США) в соответствующем буфере на ДНК-амплификаторе MiniCycler (MJResearch, США). Обратную транскрипцию проводили в течение 30 мин при 42°C, после чего осуществляли амплификацию с помощью ПЦР: 95°C – 3 мин (начальная денатурация); 36 циклов: 95°C – 20 с, 65°C – 30 с, 72°C – 30 с; 72°C – 5 мин (завершающая инкубация). Продукты ОТ-ПЦР разделяли в 4%-ном агарозном геле, окрашивали бромистым этидием.

Биологические микрочипы. Использовали биочипы, изготовленные по классической гидрогелевой технологии, применяемой в ИМБ РАН [8], а также чипы с ячейками из щеточных полимеров на основе полиакриловой кислоты с иммобилизацией олигонуклеотидных зондов с С6-аминомодификатором ковалентной амидной связью (метод изготовления чипов с ячейками из щеточных полимеров будет опубликован позднее).

Мультиплексная ОТ-ПЦР в иммобилизованной фазе. ОТ-ПЦР осуществляли с использованием набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, США). Смесь содержала природные dNTPs в концентрации 400 мкМ каждого и праймеры в концентрации 10 мкМ для каждого прямого и 0.1 мкМ для каждого обратного праймера. В качестве флуоресцентного субстрата для полимеразы использовали Cy5-dUTP в концентрации 8 мкМ. Обратную транскрипцию проводили в течение 30 мин при 42°C, после чего осуществляли амплификацию с помощью ПЦР: 95°C – 5 мин (начальная денатурация); 36 циклов: 95°C – 20 с, 64°C – 30 с, 72°C – 40 с; 72°C – 5 мин (завершающая инкубация). Температуру отжига праймеров в иммобилизованной фазе понижали на 1°C (по сравнению с реакцией в растворе) для компенсации слабого хаотропного эффекта при твердофазной амплификации. Считывание флуоресцентного сигнала с микрочипа осуществляли на чип-детекторе (ИМБ РАН, Россия).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана возможность надежной идентификации циркулирующих в России вариантов коронавируса SARS-CoV-2 с помощью системы ОТ-ПЦР, основанной на применении праймеров, специфичных к консервативному генетическому локусу – фрагменту *E*-гена. Проведена видовая идентификация шести изолятов коронавируса SARS-CoV-2, принадлежащих к различным генетическим линиям, как в общем реакционном объеме (в пробирке), так и с помощью ОТ-ПЦР непосредственно на биологических микрочипах (гидрогелевых и щеточных).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00287).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Randhawa G.S., Soltysiak M.P.M., El Roz H., de Souza C.P.E., Hill K.A., Kari L.* // PLoS One. 2020. V. 15. P. e0232391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232391>

2. Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., de Groot R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A., Haagmans B.L., Lauber C., Leontovich A.M., Neuman B.W., Penzar D., Perlman S., Poon L.L.M., Samborskiy D.V., Sidorov I.A., Sola I., Ziebuhr J. // *Nat. Microbiol.* 2020. V. 5. P. 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
3. Лана С.А., Мифтахов Р.А., Клочихина Е.С., Аммура Ю.И., Благодатских С.А., Шершов В.Е., Заседателев А.С., Чудинов А.В. // *Мол. биол.* 2021. Т. 55. С. 944–955. [Lapa S.A., Miftakhov R.A., Klochikhina E.S., Ammur Y.I., Blagodatskikh S.A., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Mol. Biol.* 2021. V. 55. P. 828–838.] <https://doi.org/10.1134/S0026893321040063>
4. Lopez L.A., Riffle A.J., Pike S.L., Gardner D., Hogue B.G. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 3000–3010. <https://doi.org/10.1128/JVI.01914-07>
5. Грачёва А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М., Борисова О.В., Петруша О.А., Смирнова Д.И., Чернышов И.И., Свитич О.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. // *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* 2021. Т. 98. С. 253–265. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>
6. Sorokin N.V., Chechetkin V.R., Livshits M.A., Pankov S.V., Donnikov M.Y., Gryadunov D.A., Lapa S.A., Zasedatelev A.S. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2005. V. 22. P. 725–734. <https://doi.org/10.1080/07391102.2005.10507039>
7. Artesi M., Bontems S., Göbbels P., Franckh M., Maes P., Boreux R., Meex C., Melin P., Hayette M.P., Bours V., Durkin K. // *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58. P. e01598–20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01598-20>
8. Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 325. P. 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.010>

Species-Level Identification of SARS-CoV-2 by E Gene Conservative Locus

S. A. Lapa^{*, #}, A. A. Shingareva^{*}, E. B. Faizuloev^{**}, Yu. I. Ammour^{**},
V. E. Shershov^{*}, and A. V. Chudinov^{*}

[#]Phone: +7 (495) 135-98-00; e-mail: lapa@biochip.ru

^{*}Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

^{**}Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, ul. 1-ya Dubrovskaya 15, Moscow, 115088 Russia

The appearance of mutations in the genes encoding the surface proteins of the new type of coronavirus SARS-CoV-2, when it circulates in the host population, makes it difficult to use monoclonal antibodies for its species identification. In such cases, the choice of conservative genetic targets allows identification by molecular biological methods. In this work, previously developed primers specific to the E gene fragment were tested to detect a new type of coronavirus on six isolates belonging to different genetic variants (the original Wuhan strain, delta and omicron). The choice of a conservative site of the E gene encoding the small transmembrane protein E as a target for reverse transcription with subsequent amplification (RT-PCR) made it possible to detect coronavirus regardless of its subtypes characterized by antigenic heterogeneity in N- and S-proteins. The possibility of species-level identification of COVID-19 pathogen circulating in Russia is shown, both in the total reaction volume (in a single test tube) and on biological microarrays.

Keywords: RT-PCR, SARS-CoV-2, species identification, immobilized primers, biological microchips