

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.215; 578.223; 578.226

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-420-430>

Поступила в редакцию 14.11.2018

Received 14.11.2018

Е. Г. Фомина, Е. Е. Григорьева, Е. П. Счесленок, П. А. Семижон, С. В. Ткачев, А. С. Владыко

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ РЕТРОВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ДОСТОВЕРНОСТИ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

Аннотация. Широкое внедрение методов обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в биологию и медицину для исследования вирусных и клеточных молекул РНК предполагает получение стабильных, хорошо охарактеризованных контролей и стандартов. Разработан новый тип внутреннего контрольного образца (ВКО) на основе рекомбинантных ретровирусных частиц для оценки эффективности выделения генетического материала и количественных параметров реакций ОТ-ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени. Препарат включает следующие компоненты: генетически модифицированные вирионы, в геном которых клонирован ген-мишень, набор праймеров и гибридизационную пробу для его детекции.

В составе рекомбинантных ретровирусов как своеобразных имитаторов природного вируса РНК защищена белковой оболочкой и устойчива к действию рибонуклеаз. Наличие контроля в каждой отдельной пробе биологического материала позволяет максимально точно учесть все факторы, влияющие на молекулу РНК в процессе исследования. Благодаря использованию такого препарата в качестве ВКО появляется возможность контролировать процессы выделения и сохранности РНК, отдельные стадии реакции обратной транскрипции и ПЦР, оценить влияние ингибиторов, содержащихся в биологических жидкостях, на ферменты реакций ОТ-ПЦР, сравнивать образцы между собой, что повышает достоверность исследования и позволяет исключить появление ложноотрицательных результатов.

Ключевые слова: диагностика, ОТ-ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени, внутренний контрольный образец, РНК-вирусы, РНК-стандарт

Для цитирования: Использование внутреннего контрольного образца на основе рекомбинантных ретровирусных частиц для повышения достоверности ПЦР-исследования / Е. Г. Фомина [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 420–430. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-420-430>

E. G. Fomina, E. E. Grigorieva, E. P. Scheslenok, P. A. Semizhon, S. V. Tkachev, A. S. Vladyko

Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

APPLICATION OF INTERNAL CONTROL BASED ON RECOMBINANT RETROVIRAL PARTICLES FOR INCREASING THE PCR ASSAY RELIABILITY

Abstract. Molecular diagnostic tests based on PCR preceded by reverse transcription (RT-PCR) are now used commonly for the detection of viral pathogens with RNA genomes. The application of internal controls to validate the entire process of these assays is necessary to prevent false-negative results caused by inhibition or inefficient extraction. In the present study a strategy to produce a new type of internal control for RT-PCR based on recombinant retroviral particles is described. Cell clones stably producing retroviral particles were established by transfecting GP+env-AM12 packaging cells with constructed MoMuLV-derived retroviral vector pLneo/gfp and subsequent cultivation on selective medium with G418. The *egfp* gene was used as a target for primers and hybridization probe design for real-time RT-PCR assay and as a marker for flow cytometry analysis of eGFP expression by transfected cells. The developed internal control is stable and ribonuclease resistant, economical to produce, noninfectious and safe for routine use. It closely mimics the natural virus and could be successfully used to monitor all the stages of RT-PCR, including nucleic acid extraction, RNA reverse transcription and amplification.

Keywords: diagnostics, real time PCR, RNA viruses, internal control, retroviral particles

For citation: Fomina E. G., Grigorieva E. E., Scheslenok E. P., Semizhon P. A., Tkachev S. V., Vladyko A. S. Application of internal control based on recombinant retroviral particles for increasing the PCR assay reliability. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 420–430 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-420-430>

Введение. Широкое использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) для обнаружения вирусных и клеточных последовательностей РНК создало потребность в разработке стабильных, хорошо охарактеризованных контролей и стандартов [1, 2].

При использовании количественных или полуколичественных вариантов реакции важна стандартизация образцов в ходе исследования по количеству и качеству выделенного генетического материала, наличию ингибиторов амплификации и эффективности реакции в каждой индивидуальной пробе, а также корректный количественный учет гена-мишени в отношении гена-сравнения в отдельной анализируемой пробе и между образцами [3]. Для этой цели используются внутренние контрольные образцы (РНК-контроли) и приготовленные на их основе стандарты. Как правило, они представляют собой препарат РНК, не схожий с РНК искомого микроорганизма, который вносится в пробу на этапе выделения генетического материала, что наряду с ПЦР позволяет контролировать процессы выделения генетического материала и реакцию обратной транскрипции (ОТ). Сложности при разработке таких препаратов связаны с тем, что не защищенные белками (неармированные) молекулы РНК нестабильны и легко подвергаются расщеплению рибонуклеазами [4].

В зависимости от решаемых задач на практике наиболее часто используются следующие типы РНК-контролей: матричные РНК генов домашнего хозяйства; транскрибированные *in vitro* молекулы РНК и генно-инженерные стандарты (рекомбинантные бактериофаги и вирусы животных) [5, 6]. Эволюция технологии получения таких стандартов для диагностики РНК-содержащих вирусов связана с тем, что контрольный образец должен полностью имитировать природный вирусный агент, но в то же время не являться инфекционным. Корректность результатов при использовании любого из предложенных контролей может быть достигнута только в том случае, если последовательность, включающая ген сравнения, прошла все этапы пробоподготовки исследуемого гена-мишени: от выделения генетического материала до учета результатов [7, 8].

Наиболее популярная стратегия нормирования образцов – использование внутренних контролей, в качестве которых выступает мРНК одного из трех генов домашнего хозяйства клетки, кодирующих β-актин (*Actb*), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (*Gapdh*) и рибосомный белок L30 (*Rpl30*). Однако в последнее время все чаще приводятся данные, свидетельствующие о том, что уровень экспрессии этих генов не всегда стабилен и варьируется в зависимости от экспериментальных (в том числе температурных) условий [9, 10]. В любом случае при использовании указанных генов в качестве внутренних контрольных образцов (ВКО) требуется предварительный анализ их пригодности для выбранных условий эксперимента. Такой тип внутренних контролей может быть весьма полезен, когда речь идет о выявлении внутриклеточных паразитов, где важна оценка наличия в пробе клеточного биологического материала для исследования.

Как альтернатива использованию внутреннего образца существует подход, основанный на применении транскрибированных *in vitro* молекул РНК, которые вносят в исследуемые пробы на этапе выделения генетического материала. Однако практика показывает, что эти контроли ненадежны, поскольку ряд факторов (щелочная рН, высокая температура, бивалентные катионы магния и марганца и даже минорные концентрации рибонуклеаз) приводит к быстрому разрушению молекул [11].

Интересным является способ получения рибонуклеиновых фаговых частиц в качестве контрольного образца как простого и надежного препарата количественной оценки в экспериментах ОТ-ПЦР. Несмотря на то что данный способ был предложен в 1998 г. [12], до настоящего времени он применяется в различных модификациях [13–16]. Используя технологию армированной РНК, с 1 л культуры *E. coli* можно получать до 10^{15} фаговых частиц. Недостаток этого способа, по мнению самих авторов, состоит в том, что эффективность упаковки РНК в фаговую частицу значительно снижается, если размер клонированного фрагмента составляет более 500 пар нуклеотидов (п. н.). На сегодняшний день этот факт трудно отнести к недостаткам в рутинных исследованиях, поскольку ПЦР-мишень редко превышает 500 п. н., особенно ввиду интенсивного использования амплификации с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени, где рекомендуемый размер гена-мишени не должен составлять более 200 п. н. Тем не менее, при решении специальных задач ограничение размера клонированного фрагмента может стать серьезным лимитирующим фактором. Одно из несомненных достоинств контроля такого типа – гиперустойчивость к влиянию факторов окружающей среды (способность сохранять свойства при инкубировании в плазме крови при 37 °С в течение 30 дней). Эта особенность одновременно является, на наш взгляд, и недостатком, когда речь идет об использовании данного контроля

в клинической диагностике, связанной с выявлением геномов РНК-содержащих патогенов. Как правило, большинство природных РНК-содержащих вирусов животных и человека весьма чувствительны к температурным и биохимическим условиям окружающей среды. Подобный контроль в силу своей устойчивости может дать ложное представление о сохранности генетического материала в образце и качестве проведения процедуры выделения. Отсутствие накопления флуоресцентного сигнала для искомой мишени патогена в исследуемой пробе в этом случае не может достоверно свидетельствовать о реальном отсутствии вируса в образце, даже при наличии четко детектируемой специфической флуоресценции для внутреннего контроля, свидетельствующей о корректности пробоподготовки.

Наиболее приближенным с физиологической и биохимической точки зрения к природным РНК-содержащим вирусам является разработанный и предлагаемый нами универсальный контрольный образец на основе ретровирусных частиц. Этот способ получения контрольных образцов был подсказан самой природой. Жизненный цикл ретровирусов включает стадию ОТ и последующую интеграцию генома в геном клетки-хозяина. В форме ДНК-провируса их геном может стабильно поддерживаться в ряду поколений, продуцируя ретровирусные частицы.

Суть данного подхода заключается в получении рекомбинантных ретровирусных частиц на основе генома вируса лейкемии мышей Молони с использованием «пакующей» клеточной линии. Клонированная в ретровирусный вектор последовательность гена-мишени экспрессируется в форме РНК-копий вместе с клеточными генами и упаковывается в ретровирусные частицы, выделяемые клетками в среду культивирования. Подготовленная специальным образом культуральная жидкость «пакующей» клеточной линии может быть использована в качестве контрольного образца.

Цель настоящего исследования – разработать внутренний контрольный образец на основе рекомбинантных ретровирусных частиц для оценки эффективности выделения генетического материала и количественных параметров реакций обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени.

Материалы и методы исследования. Все генно-инженерные манипуляции проводили с использованием коллекционного штамма *Escherichia coli* DH5 α (*supE44 lacU169 (f80 lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*). Трансформацию бактериальных клеток, выделение плазмидной ДНК, электрофоретический анализ фрагментов осуществляли согласно рекомендациям, приведенным в руководстве [17]; рестрикцию, лигирование плазмидной ДНК и фрагментов – в соответствии с условиями, рекомендуемыми фирмой-изготовителем Thermo Scientific (США). Для выделения вирионной РНК использовали набор реагентов «РИБО-преп» («АмплиСенс», Российская Федерация) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили со случайными праймерами с использованием набора «Реверта-Л» (производство ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, Российская Федерация) согласно прилагаемой инструкции. Для постановки ПЦР использовали Taq-полимеразу, 10-кратный реакционный буфер, раствор MgCl₂, смесь дезоксирибонуклеотидов (Thermo Scientific, США), а также праймеры и гибридационные зонды, синтезированные ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь). ПЦР осуществляли на термоциклере Corbett Research (Corbett Life Sciences, Австралия), ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени – на амплификаторе iQ5 (Bio-Rad, США). Для подбора праймеров и гибридационной пробы использовали программу Vector NTI. Секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили с помощью Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции по применению. Электрофорез и анализ продуктов реакции выполняли на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США). Для поиска последовательностей, гомологичных выявленным фрагментам ДНК, использовали BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

«Пакующая» клеточная линия GP+env-AM12, продуцирующая ретровирусные вирионы с амфотропным спектром хозяев, а также линия клеток NIH 3T3, созданная на основе фибробластов мыши и используемая для определения биологического титра вируса, были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК П) (г. Санкт-Петербург, Российская Федерация). Клеточные линии культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США), 2 мМ L-глутамин (Sigma, США), 100 ед/мл пенициллина (Sigma, США), 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США) при температуре 37 °С и 5%-ном содержании CO₂.

Ретровирусный вектор вводили в «пакующую» клеточную линию GP+env-AM12 посредством полибреновой методики трансфекции. Для этого $4 \cdot 10^5$ клеток «пакующей» линии помещали во флакон с площадью ростовой поверхности 25 см^2 за день до постановки эксперимента. На 2-й день среду культивирования заменяли 1 мл свежей среды, содержащей 10 мкг плазмидной ДНК, и инкубировали в течение 6 ч в присутствии 10 мкг/мл полибрена (Sigma, США). Затем проводили химический «шок» в присутствии 20 % DMSO (Sigma, США) в течение 5 мин, далее клетки отмывали и помещали в свежую среду. На следующий день культуральную среду заменяли на селективную, содержащую 400 мкг/мл G418 (Sigma, США) (химический аналог неомицина). Клоны, устойчивые к антибиотику, изолировали на 12–14-й день после трансфекции и размножали в монослое для последующего анализа.

Титр вируса определяли согласно модифицированному протоколу, описанному в статье D. Markowitz [18]. Культуральную жидкость, собранную от клонов клеток GP+env-AM12, трансфицированных ретровирусным вектором, центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g для удаления клеток и дебриса. Инфицирование проводили немедленно после сбора вируса. Реципиентные клетки NIH 3T3 высевали с плотностью $3 \cdot 10^5$ на 25 см^2 во флаконы за 24 ч до инфицирования. На второй день среду заменяли на 1 мл свежей среды, содержащей 8 мкг/мл полибрена и аликвоты тестируемого вируса. Инкубирование проводили в течение 2 ч, после чего среду заменяли на свежую. Количество клеток, экспрессирующих eGFP, анализировали спустя 72 ч после инфицирования с помощью проточного цитофлуориметра (BD Biosciences FACSCanto I, США). Титр вирусных частиц рассчитывали по следующей формуле: титр вируса = $AB/100C$, где A – количество клеток в культуральном сосуде на момент инфицирования; B – количество флуоресцирующих клеток; C – корректирующий коэффициент, учитывающий разведение супернатанта, нанесенное на клетки.

Результаты и их обсуждение. Исходным вектором для клонирования выбран «минимальный» ретровирусный вектор серии pL [19]. Данный вектор получен на базе генома вируса лейкемии мышей Молони (MoMuLV). Его ретровирусная часть содержит только *цис*-действующие последовательности (регуляторные элементы), необходимые для репликации, и включает длинные концевые повторы (LTR – long terminal repeat); Ψ – область упаковки-димеризации вирусного генома; PBS (primer binding site) – сайт связывания т-РНК затравки; полипуриновый тракт – сайт инициации синтеза плюс-цепи ДНК (PPT, polypurine tract). По концам LTR расположены два небольших, частично инвертированных повтора (att-сайты), необходимых для интеграции провируса в геном инфицированной клетки. Дополнительно в вектор клонирован полилинкер, содержащий сайты узнавания ферментов рестрикции. Бактериальная часть вектора представлена плазмидой pBR 322.

В ретровирусный вектор были клонированы две функционально значимые нуклеотидные последовательности: одна из них кодирует зеленый флуоресцирующий белок (*egfp*), другая – аминокликозид 3'-фосфотрансферазу (*neo*) [19].

В настоящее время белок GFP и его мутантные рекомбинантные формы, отличающиеся от белка дикого типа стабильностью и интенсивностью свечения, широко используются в качестве светящейся метки в клеточной и молекулярной биологии для изучения экспрессии клеточных белков [20, 21]. Наличие данной последовательности в векторе позволяет решить две задачи: использовать ее в качестве мишени для подбора праймеров и гибридизационной пробы для контроля выделения РНК-матрицы и всех стадий ОТ-ПЦР в режиме реального времени, а также определить титр ретровирусных частиц, продуцируемых «пакующей» клеточной линией, с использованием проточного цитофлуориметра с целью последующей количественной оценки содержания геном-эквивалентов гена-мишени в пробе. Наличие последовательности, кодирующей ген *neo* (обеспечивает устойчивость к неомицину), необходимо для отбора клеточных клонов с интегрированным в геном клетки вектором на селективной среде, содержащей генетицин (G418) – химический аналог неомицина, токсичный для клеток эукариот.

Указанные последовательности были амплифицированы и последовательно клонированы в «минимальный» ретровирусный вектор. Наличие вставки было подтверждено рестрикцией рекомбинантных плазмид по сайтам клонирования (рис. 1), а специфичность клонированных фрагментов – секвенированием.

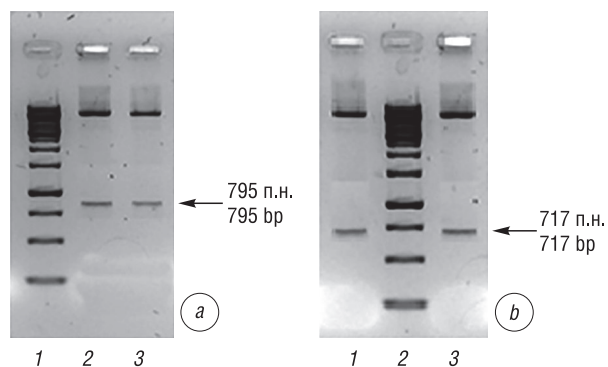


Рис. 1. Электрофоретический анализ рекомбинантной плазмидной ДНК: *a* – плазмидная ДНК pLneo после обработки рестрикционными нуклеазами HindIII и XbaI (1 – маркер молекулярных масс 1 kb DNA ladder, Thermo Scientific; 2, 3 – рекомбинантная плазмидная ДНК); *b* – плазмидная ДНК pLneo/gfp после обработки рестрикционными нуклеазами XhoI и BamHI (1, 3 – рекомбинантная плазмидная ДНК; 2 – маркер молекулярных масс 1 kb DNA ladder, Thermo Scientific)

Fig. 1. Analysis of recombinant plasmid DNA by restriction digestion and agarose gel electrophoresis: *a* – plasmid DNA pLneo after endonucleases HindIII and XbaI digestion (1 – 1 kb DNA ladder, Thermo Scientific; 2, 3 – recombinant plasmid DNA); *b* – plasmid DNA pLneo/gfp after endonucleases XhoI and BamHI digestion (1, 3 – recombinant plasmid DNA; 2 – 1 kb DNA ladder, Thermo Scientific)

Следует отметить, что в данном случае речь идет об инфекционном титре, но при расчете геном-эквивалентов (ГЭ) следует учитывать два обстоятельства: первое – ретровирусный геном содержит две идентичные молекулы РНК, второе – часть вирусных частиц может содержать репортерный ген в своем составе, но быть неинфекционной по ряду причин. Реальный физический титр, коррелирующий с количеством геном-эквивалентов, был определен в реакции ОТ-ПЦР с использованием метода конечных разведений. Для этого готовили 10-кратные разведения

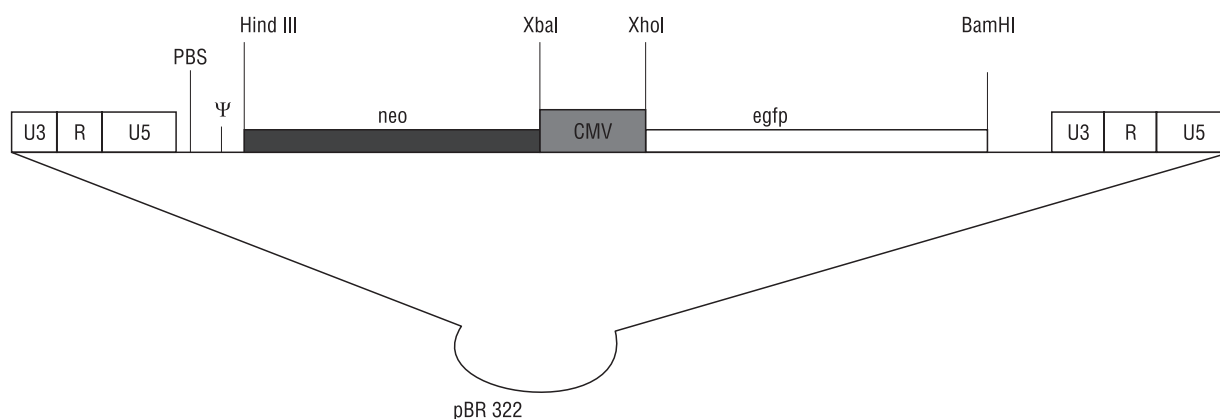


Рис. 2. Структура ретровирусного вектора pLneo/gfp: U3, R, U5 – районы вирусного LTR; Ψ – область упаковки-димеризации вирусного генома; PBS (primer binding site) – сайт связывания т-РНК затравки; *neo* – нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокликозид 3'-фосфотрансферазу; промотор ранних генов цитомегаловируса человека (CMV); *egfp* – ген, кодирующий белок eGFP (enhanced green fluorescent protein); BamHI, HindIII, XbaI, XhoI – сайты рестрикции

Fig. 2. pLneo/gfp retroviral vector structure: U3, R, U5 – regions of long terminal repeat; Ψ – extended retroviral packaging signal; PBS – primer binding site; *neo* – neomycin phosphotransferase gene; CMV – human cytomegalovirus (CMV) early promoter region; *egfp* – enhanced green fluorescent protein gene; BamHI, HindIII, XbaI, XhoI – restriction sites

Структура результирующего ретровирусного вектора pLneo/gfp представлена на рис. 2.

Рекомбинантная плазмидная ДНК pLneo/gfp посредством полибренновой методики трансфекции была введена в клетки «пакующей» линии GP+env-AM12. Данная линия клеток получена на базе мышиных фибробластов NIH 3T3, в которые введены вирус-кодирующие последовательности gag-pol и env, не содержащие Ψ-область, ответственную за упаковку вирусного генома в вирион. Такая клеточная линия продуцирует «пустые» вирионы. При введении ретровирусного вектора в клетки «пакующей» линии он интегрирует в геном клетки-хозяина, может эффективно транскрибироваться и упаковываться в вирионы.

После трансфекции и последующего культивирования клеток на селективной среде получены клоны мышиных фибробластов GP+env-AM12Lneo/gfp, продуцирующие в культуральную жидкость рекомбинантные вирионы с титром не менее $2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Титр ретровирусных частиц определяли с использованием индикаторной клеточной линии NIH 3T3 на проточном цитофлуориметре путем подсчета клеток, экспрессирующих eGFP, для трех независимых клеточных клонов (рис. 3).

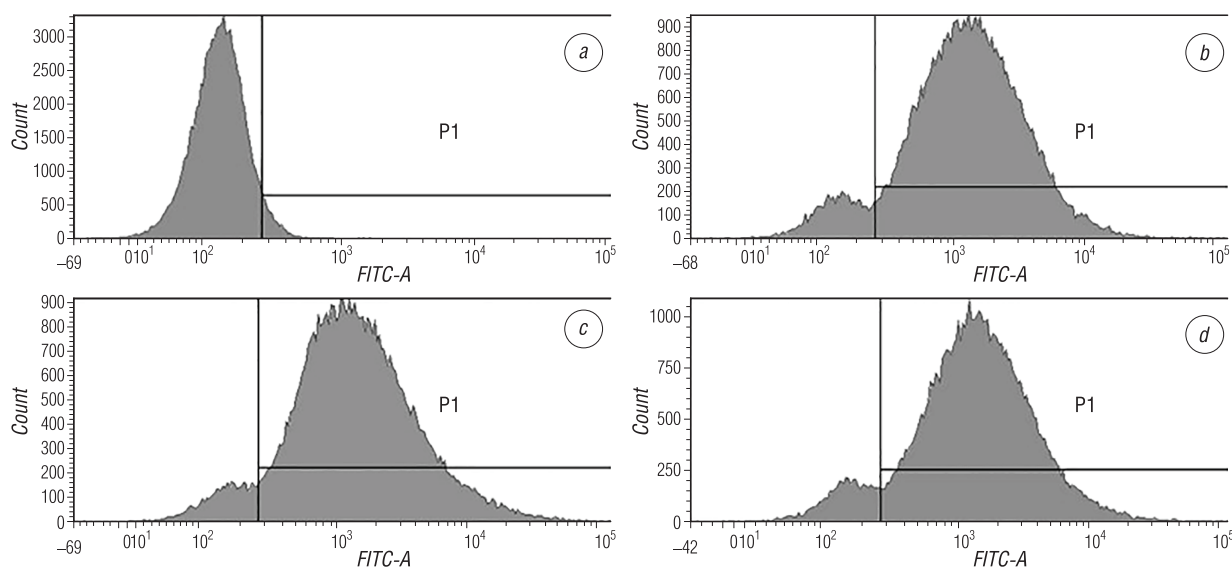


Рис. 3. Определение количества клеток, экспрессирующих eGFP, на проточном цитофлуориметре: *a* – контрольные клетки; *b, c, d* – клоны клеток NIH 3T3, инфицированные культуральной жидкостью, собранной с «пакующей» клеточной линии, трансфицированной ретровирусным вектором pLneo/gfp

Fig. 3. The number of cells expressing eGFP determined by flow cytometry: *a* – control cells; *b, c, d* – clones of NIH 3T3 cells infected by culture medium from packaging cells transfected with retroviral vector pLneo/gfp

супернатанта «пакующей» клеточной линии, определив исходную точку отсчета как титр инфекционных частиц, равный $2 \cdot 10^6$ ГЭ/мл. Из проб выделяли вирионную РНК и использовали ее в качестве матрицы для проведения ОТ-ПЦР последовательности *egfp* с подобранной парой праймеров, ограничивающих фрагмент размером 96 п. н., в режиме реального времени.

В проведенных экспериментах коэффициент пересчета физических/инфекционных частиц составил 1000, следовательно, в 1 мл культуральной жидкости содержится не менее $2 \cdot 10^9$ ГЭ гена-мишени. Как правило, в клинических исследованиях важны не абсолютные, а относительные цифры, полученные в серии сравнительных экспериментов (например, в парных сыворотках до и после терапии пациента). Тем не менее, точное количество геном-эквивалентов, внесенное в реакцию, дает представление об эффективности процессов исследования генетического материала и может быть использовано для приготовления стандартных образцов и учета четких количественных показателей реакции ОТ-ПЦР.

Одним из условий универсальности контрольного образца считается возможность его амплификации в широком диапазоне различных параметров ПЦР: температура, концентрация ионов магния, буферная система и др. Праймеры и гибридизационная проба, подобранные для определения репортерного гена, были исследованы на соответствие этому условию.

Для оценки влияния температурных параметров на амплификацию гена-мишени использовали градиент температур для отжига праймеров в диапазоне от 45 до 65 °С. Результаты исследования представлены на рис. 4.

Как видно из рис. 4, подобранная пара праймеров «работает» в широком температурном диапазоне. Накопление продукта амплификации фрагмента гена зеленого флуоресцирующего белка (*egfp*) регистрировалось при всех использованных значениях температуры отжига праймеров. Кривые флуоресцентного сигнала пересекали пороговую линию практически в одной точке, но отличались высотой подъема. При этом кинетическая кривая ПЦР сохраняла классическую сигмовидную форму, что свидетельствует о высокой эффективности реакции в температурном диапазоне 45–65 °С.

Сходные данные были получены при амплификации гена-мишени в диапазоне 1,5–3 мМ (1,5; 2,0; 2,5; 3,0 мМ) конечной концентрации $MgCl_2$. Анализ кривой накопления флуоресцентного сигнала показал, что образование продукта амплификации специфического фрагмента гена *egfp* наблюдалось при всех использованных в эксперименте значениях концентрации соли, при этом оптимальной являлась концентрация Mg^{2+} 3,0 мМ в конечном (50 мкл) объеме реакционной смеси (данные не представлены).

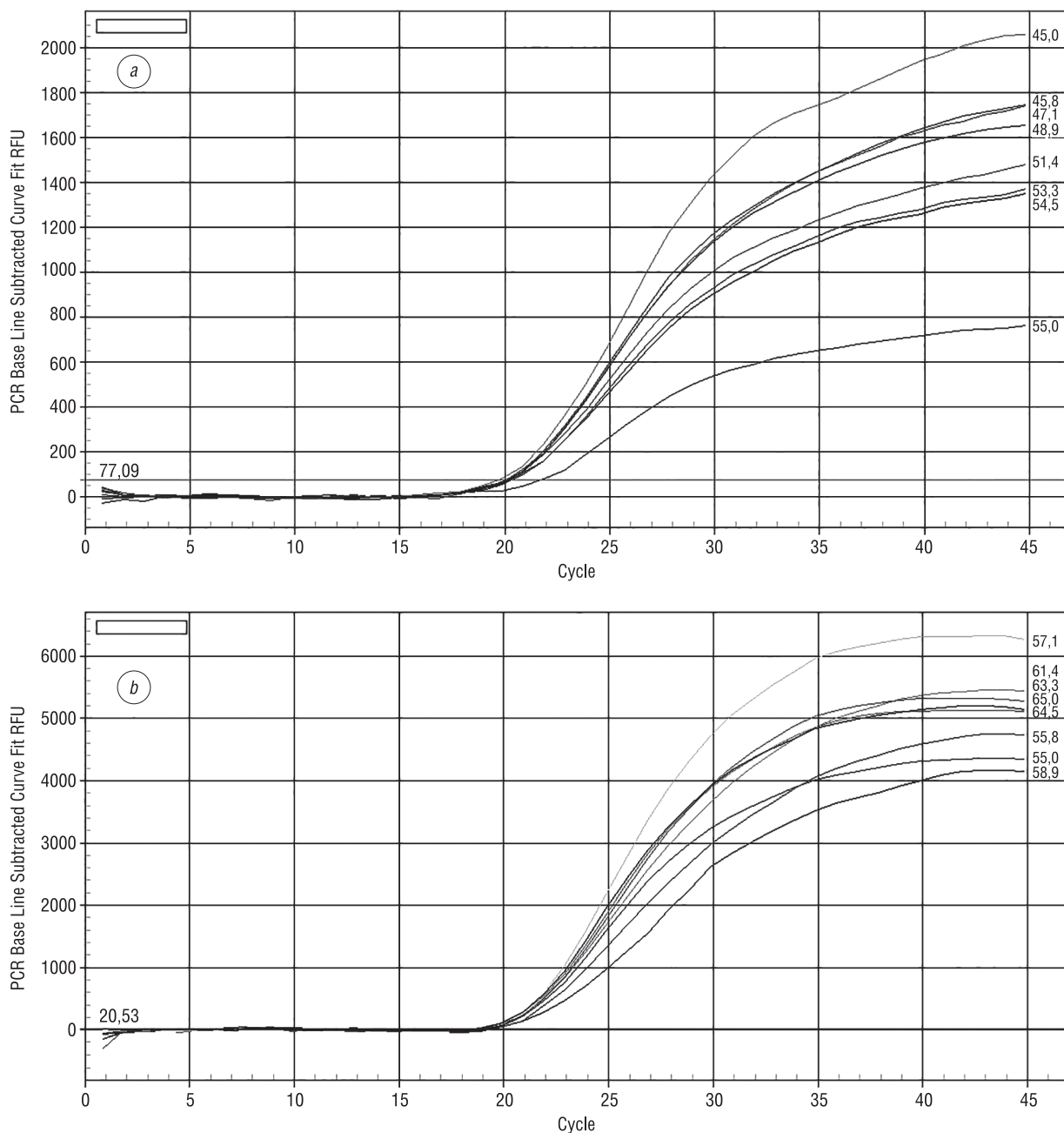


Рис. 4. Амплификация фрагмента гена *egfp* в ходе ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени при градиенте температуры отжига праймеров: *a* – 45–55 °С; *b* – 55–65 °С

Fig. 4. Amplification chart of the real time PCR assay for *egfp* gene using gradient protocol for the annealing temperature: *a* – 45–55 °С; *b* – 55–65 °С

При проведении экспериментов РНК-контроль вносили в реакцию в минимальном количестве – 10 мкл. Это является важным обстоятельством, так как, с одной стороны, позволяет увеличить объем пробы биологического материала, взятой для исследования, с другой – этого количества достаточно, чтобы детектировать сигнал амплификации мишени в каждом исследуемом образце.

Принято считать, что величина амплифицируемого гена-мишени инфекционного агента должна быть меньше мишени ВКО в 2–3 раза для обеспечения конкурентных преимуществ в ходе ПЦР. Если же речь идет о реакции с детекцией продуктов в режиме реального времени, где размер амплифицируемых фрагментов находится в пределах 100 п. н., то данное утверждение является спорным. Размер продукта амплификации ВКО составляет 96 п. н. Тем не менее, для

образцов, содержащих малые количества РНК искомого возбудителя инфекции, нами предлагается другой подход, который заключается в двукратном уменьшении концентрации праймеров и пробы от оптимальной для амплификации ВКО. В этом случае при наличии сигнала детекции ВКО он не будет конкурировать даже с минимальным количеством РНК инфекционного агента.

Заключение. Рекомбинантные ретровирусные частицы как имитаторы природного вируса позволяют максимально точно учесть факторы, влияющие на молекулу РНК в процессе исследования пробы биологического материала. Благодаря использованию в качестве внутреннего контроля препарата, разработанного на их основе, появляется возможность контролировать процессы выделения и сохранность РНК, отдельные стадии реакции ОТ-ПЦР, оценить влияние ингибиторов, содержащихся в биологических жидкостях, на ферменты реакций ОТ-ПЦР, что повышает достоверность исследования и дает возможность исключить появление ложноотрицательных результатов.

Преимущества РНК-стандарта заключаются в следующем:

РНК упакована в ретровирусную частицу, что делает ее недоступной для действия РНКаз и, следовательно, стабильной;

наличие вирусной оболочки позволяет контролировать этап выделения РНК из вируса, аналогично выделению из биологической жидкости (кровь, сыворотка, плазма, суспензии органов грызунов и др.);

внесение РНК-контроля в пробу до этапа выделения генетического материала позволяет оценить количество и качество выделенной РНК;

«пакующая» клеточная линия стабильно продуцирует ретровирусные частицы с определенным титром (количеством инфекционных единиц на 1 мл), что дает возможность стандартизовать процесс и количественно сравнивать пробы между собой;

клеточная линия может быть депонирована и использована на протяжении многих лет, не требуя дополнительных генно-инженерных манипуляций;

рекомбинантные ретровирусные частицы не инфекционны и безопасны в использовании;

подобранные для амплификации ВКО пара праймеров и гибридизационная проба могут работать в широком диапазоне температур, концентраций ионов магния и состава ПЦР-буферов, содержащих как KCl, так и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;

предложенная технология получения рекомбинантных ретровирусных частиц позволяет использовать данный подход для получения положительных контрольных образцов РНК-содержащих вирусов.

Разработанный препарат может найти свою нишу в различных областях биологии и медицины при диагностике инфекционных, генетических, онкологических заболеваний, а также в быстро развивающейся в последнее время так называемой персонифицированной медицине. Например, он может быть использован при определении индивидуальных различий пациентов в восприимчивости и метаболизме лекарств и их производных, когда при изучении экспрессии различных генов необходимо количественно сравнить пробы между собой.

Наличие такого стандарта особенно полезно, когда речь идет о так называемых трудозатратных образцах, требующих длительного пробоподготовительного этапа: выделение РНК из органов, приготовление суспензии клещей и др. Даже при соблюдении холодовой цепи сохранность генетического материала в первой выделяемой пробе может отличаться от последней. Внутренний контрольный образец позволяет контролировать этот процесс.

На основе рекомбинантных ретровирусных частиц разработан набор реагентов «Универсальный РНК-стандарт». В состав набора входит внутренний контрольный образец (культуральная жидкость «пакующей» клеточной линии), праймер для постановки реакции ОТ и олигонуклеотиды (смесь праймеров и гибридизационной пробы) для ПЦР. Препарат может быть использован в качестве самостоятельного компонента при разработке и комплектации диагностических тест-систем, предназначенных для выявления геномных РНК широкого спектра РНК-содержащих вирусов методом ОТ-ПЦР; для оценки работы ферментов в ОТ-ПЦР; исследования эффективности наборов реагентов для выделения РНК при их производстве, а также в качестве стандарта при изучении экспрессии генов для нормализации образцов.

Список использованных источников

1. Нетесов, С. В. Сравнительная оценка современных методов диагностики вирусных инфекций / С. В. Нетесов, Н. А. Маркевич // Молекул. медицина. – 2008. – № 5. – С. 41–47.
2. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing / M. J. Espy [et al.] // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2006. – Vol. 19, N 1. – P. 165–256. <https://doi.org/10.1128/cmr.19.1.165-256.2006>
3. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations / J. Huggett [et al.] // *Genes Immun.* – 2005. – Vol. 6, N 4. – P. 279–284. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
4. Использование внешних и внутренних контрольных образцов при постановке полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции полимеразной цепной реакции / Т. Е. Сизикова [и др.] // *Клин. лаб. диагностика.* – 2013. – № 3. – С. 41–44.
5. Niesters, H. G. M. Molecular and diagnostic clinical virology in real time / H. G. M. Niesters // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2004. – Vol. 10, N 1. – P. 5–11. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00699.x>
6. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR / J. Hoorfar [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42, N 5. – P. 1863–1868. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.5.1863-1868.2004>
7. Felder, E. Development of a versatile and stable internal control system for RT-qPCR assays / E. Felder, R. Wölfel // *J. Virol. Meth.* – 2014. – Vol. 208. – P. 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.028>
8. Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR / G. V. Villanova [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45, N 11. – P. 3555–3563. <https://doi.org/10.1128/jcm.02601-06>
9. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR / K. Dheda [et al.] // *BioTechniques.* – 2004. – Vol. 37, N 1. – P. 112–119. <https://doi.org/10.2144/04371rr03>
10. Schmittgen, T. D. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR / T. D. Schmittgen, B. A. Zakrajsek // *J. Biochem. Biophys. Meth.* – 2000. – Vol. 46, N 1–2. – P. 69–81. [https://doi.org/10.1016/s0165-022x\(00\)00129-9](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(00)00129-9)
11. Hazari, S. Development and evaluation of a quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for hepatitis C virus RNA in serum using transcribed thio-RNA as internal control / S. Hazari, S. K. Acharya, S. K. Panda // *J. Virol. Meth.* – 2004. – Vol. 116, N 1. – P. 45–54.
12. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards / B. L. Pasloske [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – Vol. 36, N 12. – P. 3590–3594.
13. Donia, D. Use of armored RNA as a standard to construct a calibration curve for real-time RT-PCR / D. Donia, M. Divizia, A. Pana // *J. Virol. Meth.* – 2005. – Vol. 126, N 1–2. – P. 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.004>
14. Stevenson, J. The use of armored RNA as a multi-purpose internal control for RT-PCR / J. Stevenson, W. Hymas, D. Hillyard // *J. Virol. Meth.* – 2008. – Vol. 150, N 1–2. – P. 73–76. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.02.007>
15. Векторная конструкция для накопления армированной РНК / В. А. Землянский [и др.] // *Вес. НАН Беларусі. Сер. мед. навук.* – 2015. – № 2. – С. 19–22.
16. Internal control for real-time polymerase chain reaction based on MS2 bacteriophage for RNA viruses diagnostics / M. R. Zambenedetti [et al.] // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2017. – Vol. 112, N 5. – P. 339–347. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160380>
17. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual : in 3 vol. / J. Sambrook, D. W. Russell. – 3rd ed. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – Vol. 1. – 749 p.
18. Markowitz, D. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line / D. Markowitz, S. Goff, A. Bank // *Virology.* – 1988. – Vol. 167, N 2. – P. 400–406. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90101-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90101-8)
19. The U3 region of Moloney murine leukemia virus contains position-independent cis-acting sequences involved in the nuclear export of full-length viral transcripts / N. Volkova [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, N 29. – P. 20158–20169. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545855>
20. Флуоресцентные белки: физико-химические свойства и использование в клеточной биологии / О. В. Степаненко [и др.] // *Цитология.* – 2007. – Т. 49, № 5. – С. 395–420.
21. Differential rates of gene expression monitored by green fluorescent protein / C. Lu [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2002. – Vol. 79, N 4. – P. 429–437. <https://doi.org/10.1002/bit.10295>

References

1. Netesov S. V., Markevich N. A. Comparative evaluation of modern methods for viral infections diagnostics. *Molekulyarnaya medicina* [Molecular medicine], 2008, no. 5, pp. 41–47 (in Russian).
2. Espy M., Uhl J., Sloan L., Buckwalter S., Jones M., Vetter E. [et al.]. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, vol. 19, no. 1, pp. 165–256. <https://doi.org/10.1128/cmr.19.1.165-256.2006>
3. Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 2005, vol. 6, no. 4, pp. 279–284. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
4. Sizikova T. E., Mel'nikova E. V., Manoshkin A. V., Petrov A. A., Mel'nikov D. G., Pantyukhov V. B., Lebedev V. N., Borisevich S. V. The application of external and internal control objects in case of using of polymerase chain reaction and reverse transcription polymerase chain reaction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* [Clinical laboratory diagnostics], 2013, no. 3, pp. 41–44 (in Russian).

5. Niesters H. G. M. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clinical Microbiology and Infection*, 2004, vol. 10, no. 1, pp. 5–11. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00699.x>
6. Hoorfar J., Malorny B., Abdulmajjood A., Cook N., Wagner M., Fach P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, vol. 42, no. 5, pp. 1863–1868. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.5.1863-1868.2004>
7. Felder E., Wölfel R. Development of a versatile and stable internal control system for RT-qPCR assays. *Journal of Virological Methods*, 2014, vol. 208, pp. 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.028>
8. Villanova G. V., Gardiol D., Taborda M. A., Reggiardo V., Tanno H., Rivadeneira E. D., Perez G. R., Giri A. A. Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, vol. 45, no. 11, pp. 3555–3563. <https://doi.org/10.1128/jcm.02601-06>
9. Dheda K., Huggett J. F., Bustin S. A., Johnson M. A., Rook G., Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*, 2004, vol. 37, no. 1, pp. 112–119. <https://doi.org/10.2144/04371rr03>
10. Schmittgen T. D., Zakrajsek B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2000, vol. 46, no. 1–2, pp. 69–81. [https://doi.org/10.1016/s0165-022x\(00\)00129-9](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(00)00129-9)
11. Hazari S., Acharya S. K., Panda S. K. Development and evaluation of a quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for hepatitis C virus RNA in serum using transcribed thio-RNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 2004, vol. 116, no. 1, pp. 45–54.
12. Pasloske B. L., Walkerpeach C. R., Obermoeller R. D., Winkler M., DuBois D. B. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, vol. 36, no. 12, pp. 3590–3594.
13. Donia D., Divizia M., Pana A. Use of armored RNA as a standard to construct a calibration curve for real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 2005, vol. 126, no. 1–2, pp. 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.004>
14. Stevenson J., Hymas W., Hillyard D. The use of armored RNA as a multi-purpose internal control for RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 2008, vol. 150, no. 1–2, pp. 73–76. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.02.007>
15. Zemlyanskii V. A., Dedyulya K. L., Poklonskaya N. V., Amvros'eva T. V. Vector construction for production of armored nucleic acid. *Vestsi Natsyianal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medicine series*, 2015, no. 2, pp. 19–22 (in Russian).
16. Zambenedetti M. R., Pavoni D. P., Dallabona A. C., Dominguez A. C., Poersch C., Fragoso S. P., Krieger M. A. Internal control for real-time polymerase chain reaction based on MS2 bacteriophage for RNA viruses diagnostics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2017, vol. 112, no. 5, pp. 339–347. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160380>
17. Sambrook J., Russell D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Vol. 1*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 749 p.
18. Markowitz D., Goff S., Bank A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology*, 1988, vol. 167, no. 2, pp. 400–406. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90101-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90101-8)
19. Volkova N. A., Fomina E. G., Smolnikova V. V., Zinovieva N. A., Fomin I. K. The U3 region of Moloney murine leukemia virus contains position-independent cis-acting sequences involved in the nuclear export of full-length viral transcripts. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, vol. 289, no. 29, pp. 20158–20169. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545855>
20. Stepanenko O. V., Verkhusha V. V., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. Fluorescent proteins: physical-chemical properties and application in cell biology. *Tsitologiya [Cytology]*, 2007, vol. 49, no. 5, pp. 395–420 (in Russian).
21. Lu C., Albano C. R., Bentley W. E., Rao G. Differential rates of gene expression monitored by green fluorescent protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, vol. 79, no. 4, pp. 429–437. <https://doi.org/10.1002/bit.10295>

Информация об авторах

Фомина Елена Георгиевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: feg1@tut.by

Григорьева Елена Евгеньевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: grigus@mail.ru

Счесленок Елена Павловна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: elena_pavlovna@tut.by

Information about the authors

Elena G. Fomina – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: feg1@tut.by

Elena E. Grigorieva – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grigus@mail.ru

Elena P. Scheslenok – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: elena_pavlovna@tut.by

Семижон Павел Анатольевич – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pavel5555@tut.by

Ткачев Сергей Викторович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pjc40@mail.ru

Владыко Александр Станиславович – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vladuko@belriem.by

Pavel A. Semizhon – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pavel5555@tut.by

Sergey V. Tkachev – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pjc40@mail.ru

Alexander S. Vladyko – D. Sc. (Med.), Professor, Chief researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vladuko@belriem.by