

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ EXPERIMENTAL RESEARCHES

DOI: 10.29413/ABS.2019-4.5.18

Оптимизация методики количественной ОТ-ПЦР для оценки концентрации геномной +РНК вируса клещевого энцефалита

Ляпунова Н.А., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А.

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, Россия)

Автор, ответственный за переписку: Ляпунова Наталья Андреевна, e-mail: nataly2193@mail.ru

Резюме

Обоснование. Для изучения механизмов репликации вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в клетках позвоночных хозяев разных видов необходимо дифференциальное определение концентрации геномной и репликативной форм РНК (+РНК и –РНК соответственно). Однако имеющиеся в настоящее время подходы рассчитаны на измерение суммарного количества вирусной РНК. Для достоверного определения количества вирусной РНК на разных стадиях репликативного цикла требуется оптимизация методики ОТ-ПЦР.

Цель исследования. Разработать панель стандартных образцов синтетической ВКЭ и оптимизировать ОТ-ПЦР для специфичного количественного определения геномной +РНК вируса.

Методы. Фрагмент геномной +РНК ВКЭ синтезировали с использованием плазмидного вектора pTZ57R-T₇A со встроенным промотором T₇ и соответствующей РНК-полимеразы. Контаминирующую ДНК удаляли с помощью обработки свободной от РНКаз ДНКазой I и дополнительного этапа выделения РНК. Обратную транскрипцию проводили с использованием специфичного антисмыслового праймера 11154R 5'-AGCGGGTGTGTTTTCGG-3', а количественное определение с помощью ПЦР выполняли согласно М. Schwaiger и Р. Cassinotti (2003) с модификациями.

Результаты. В результате амплификации стандартных образцов концентрации РНК ВКЭ положительной полярности, проведённой в пяти независимых повторах в разные дни, коэффициент корреляции R² между циклом количественного определения и концентрацией стандартного образца составил 0,99, а эффективность ПЦР составила 100%. Характеристики воспроизводимости, линейности и эффективности ПЦР свидетельствуют о валидности определения концентрации РНК ВКЭ. Коэффициент вариации при оценке межтестовой точности определения в среднем составил 2,8%, что сопоставимо с показателями оригинальной методики.

Заключение. Оптимизированная количественная ОТ-ПЦР позволяет проводить рутинное лабораторное определение количества геномной РНК ВКЭ.

Ключевые слова: флавивирусы, вирус клещевого энцефалита, РНК, количественная ОТ-ПЦР.

Для цитирования: Ляпунова Н.А., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А. Оптимизация методики количественной ОТ-ПЦР для оценки концентрации геномной +РНК вируса клещевого энцефалита. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 116-121. doi: 10.29413/ABS.2019-4.5.18

Optimization of a Quantitative Real-Time RT-PCR Technique for Evaluation of Concentration of Genomic +RNA of Tick-Borne Encephalitis Virus

Liapunova N.A., Khasnatinov M.A., Danchinova G.A.

Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazev str. 16, Irkutsk 664003, Russian Federation)

Corresponding author: Natalia A. Liapunova, e-mail: nataly2193@mail.ru

Abstract

Background. The specific detection of genomic/template +RNA and replicative –RNA of tick-borne encephalitis virus (TBEV) is necessary to study the mechanisms of viral replication in the cells of reservoir and accidental hosts. However, the current approaches of quantitative reverse transcription – polymerase chain reaction (qRT-PCR) are rather focused on the detection of total viral RNA load in the sample. Thus, the significant optimization is necessary both for RT-PCR and for RNA copy number standard preparation.

Aims. To develop the set of standard samples of synthetic +RNA of TBEV and to optimize qRT-PCR for quantification of genomic +RNA of the virus.

Materials and methods. Fragment of the genomic +RNA of TBEV was synthesized using pTZ57R-T₇A plasmid vector with embedded T₇ promoter and T₇ RNA polymerase. The DNA contamination was removed using RNase-free DNase I treatment followed by additional RNA purification step. Reverse transcription was performed using specific antisense primer 11154R 5'-AGCGGGTGTGTTTTCGG-3' and qPCR detection was used according to the modified procedure of M. Schwaiger and P. Cassinotti (2003).

Results. As a result of the amplification of standard samples, the concentration of positive polarity TBEV RNA, carried out in five independent repetitions on different days, the correlation coefficient R^2 between the quantification cycle and the concentration of the standard sample was 0.99, and the efficiency of PCR was 100 %. The coefficient of variation in assessing the inter-test accuracy of determination averaged 2.8 %.

Conclusions. Optimized qRT-PCR procedure and set of +RNA standards allow to determine the concentration of genomic +RNA of TBEV in routine laboratory practice.

Key words: Flavivirus, tick-borne encephalitis virus, RNA, quantitative RT-PCR in real time

For citation: Liapunova N.A., Khasnatinov M.A., Danchinova G.A. Optimization of a Quantitative Real-Time RT-PCR Technique for Evaluation of Concentration of Genomic +RNA of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 116-121. doi: 10.29413/ABS.2019-4.5.18

ОБОСНОВАНИЕ

Клещевой энцефалит (КЭ) является тяжёлой нейроинфекцией, передающейся при укусах иксодовых клещей, и распространён в северной, центральной и восточной Европе, в Российской Федерации и на Дальнем Востоке. Ежегодно только в Российской Федерации регистрируется 2000–3700 случаев заболевания [1]. Возбудитель заболевания – вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) – относится к семейству *Flaviviridae*. На основании филогенетических исследований большинство исследователей выделяют три субтипа ВКЭ – Европейский, Дальневосточный и Сибирский [2]. В последние годы некоторые авторы выделяют также Байкальский [3] и Гималайский субтипы [4]. Помимо ВКЭ, семейство *Flaviviridae* включает возбудителей таких заболеваний, как лихорадка Денге, японский энцефалит, лихорадка западного Нила, энцефалит Сент-Луис, жёлтая лихорадка, гепатит С, лихорадка Зика. Как и у всех флавивирусов, геном ВКЭ состоит из линейной положительно заряженной одноцепочечной молекулы РНК длиной около 10,5 тыс. нуклеотидных оснований (н. о.) [5, 6]. Одна длинная открытая рамка считывания между двумя короткими некодирующими последовательностями кодирует все вирусные белки [7]. В начале внутриклеточного репликативного цикла на матрице вирионной +РНК синтезируются репликативные минус-цепи РНК. Далее на их основе синтезируются как дочерние геномные копии +РНК ВКЭ для формирования новых вирионов, так и матричные +РНК для трансляции полипротеина [8]. Синтез минус- и плюс-цепей РНК является ассиметричным процессом – минус-цепи служат матрицей для нескольких раундов синтеза плюс-цепей [8]. Было установлено, что в процессе репликации вируса вторых образуется в 10–100 раз больше, чем первых [9].

Стабильно напряжённая эпидемиологическая ситуация на территориях, эндемичных по КЭ, и тяжесть заболевания требуют совершенствования методов исследования и диагностики инфекции. Среди современных молекулярно-генетических методов одно из основных мест занимает полимеразная цепная реакция (ПЦР) [10, 11]. Главным преимуществом ПЦР как в научных, так и в диагностических исследованиях является высокочувствительное и высокоспецифичное определение геномной РНК/ДНК инфекционного агента, позволяющее провести прямое обнаружение вируса [12, 13, 14]. Кроме того, ПЦР позволяет произвести и измерение количества копий геномной РНК ВКЭ, что может быть использовано для сравнительного изучения эпидемиологической ситуации на эндемичных территориях, для скрининга природных очагов на наличие ВКЭ и его циркуляции, а также для исследования эффективности

репликации РНК ВКЭ на разных стадиях жизненного цикла вируса [15, 16].

Для количественного выявления РНК ВКЭ используют ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР), основанную на выщеплении 5'-концевой метки с помощью 5'-экзонуклеазной активности полимеразы (TaqMan Assay). Зонд TaqMan содержит флуоресцентную метку на 5'-конце и флуоресцентный гаситель на 3'-конце [17]. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу. В ходе ПЦР во время стадии отжига праймеров происходит присоединение ДНК-зонда к комплементарной цепи ДНК. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и при достижении зонда начинает его расщеплять благодаря наличию 5'-3' экзонуклеазной активности [18]. Происходит разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к увеличению детектируемого свечения, которое прямо пропорционально накоплению ПЦР-продукта [19]. Количественное определение концентрации РНК производится на основе сравнения динамики накопления ПЦР-продукта в образце с динамикой накопления продуктов ПЦР в панели стандартных образцов, содержащих известное число копий целевого фрагмента РНК ВКЭ.

В настоящее время нами проводятся исследования эффективности репликации РНК ВКЭ в культурах клеток резервуарных и случайных хозяев [20]. При этом становится актуальной дифференцированная оценка эффективности внутриклеточного синтеза +РНК и –РНК ВКЭ. Ранее нами была использована методика, разработанная M. Schwaiger и P. Cassinotti [17], а в качестве стандартных образцов были использовали фрагменты ДНК-копий генома ВКЭ, клонированные в плазмидном векторе [20]. Такой подход снижает точность определения количества РНК и не позволяет учесть все факторы, влияющие на результат эксперимента в процессе пробоподготовки. Кроме того, точное воспроизведение оригинального дизайна эксперимента не даёт возможности различать концентрацию +РНК и –РНК в смешанном образце. Для оптимизации методики мы применили селективный синтез комплементарной ДНК на матрице +РНК с помощью цепеспецифичного праймера обратной транскрипции, а также разработали панель соответствующих стандартных образцов +РНК.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработать панель стандартных образцов синтетической +РНК ВКЭ и оптимизировать ОТ-ПЦР для специфичного количественного определения геномной +РНК ВКЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование матрицы для *in vitro* транскрипции

Для амплификации целевого фрагмента вирусного генома использовали изолят ВКЭ Сибирского субтипа 92М [21]. Вирус поддерживали в культуре клеток СПЭВ. Суммарную РНК выделяли из надклеточной жидкости с помощью наборов «РибоПреп» (Амплисенс). Обратную транскрипцию проводили с использованием комплекта Реверта-Л (Амплисенс, Москва). Консервативную часть 3'-конца генома амплифицировали в ПЦР с помощью праймеров 10072F (5'-GCTTGGATGACCACAGAGGAC-3') и 11154R (5'-AGCGGGTGTTCCTCCG-3'). Полученный ампликон длиной 853 н. о. лигировали в плазмидный вектор pTZ57R-TVA (Fermentas, Литва) и клонировали в компетентных клетках *E. coli* DH5alpha по протоколу [22]. Селекцию корректных клонов производили с помощью ПЦР-скрининга с фланкирующими ПЦР-праймерами 10072F и 11154R. Итоговая конструкция содержала целевой фрагмент, клонированный в направлении 5' → 3' +1G под промотором РНК полимеразы Т7, что позволяет синтезировать *in vitro* смысловую цепь РНК (+РНК) ВКЭ (рис. 1). Клон pTZ57R_TBEV-92M_10072-11154 с корректной вставкой наращивали в 100 мл жидкой LB-среде с добавлением ампициллина в течение ночи. Плазмидную ДНК очищали с помощью набора АхуPrep Plasmis miniprep kit (Ахуген, США), согласно инструкции производителя, и растворяли в 150 мкл стерильной бидистиллированной воды. Плазмиду линеаризовали эндонуклеазой PstI (Сибэнзим, Новосибирск) при 37 °С в течение 1 ч (рис. 1). Эффективность лизиса оценивали электрофоретически. Линейную конструкцию использовали в качестве матрицы в транскрипции РНК *in vitro*.

Транскрипция РНК *in vitro*

Реакционная смесь в объёме 50 мкл содержала 200U Т7 РНК-полимеразы (Сибэнзим, Новосибирск), 1 mM рНТФ (ДНК-синтез, Москва) и 80U ингибитора РНКаз «RNasin» (Promega, США), 5 мкл 10X Т7 буфера и свободную от рибонуклеаз воду до выполнения объёма. Количество линеаризованной матрицы pTZ57R_TBEV-92M_10072-11154 варьировали в процессе оптимизации условий реакции от 0,1 до 1 мкг.

Очистка синтетической РНК

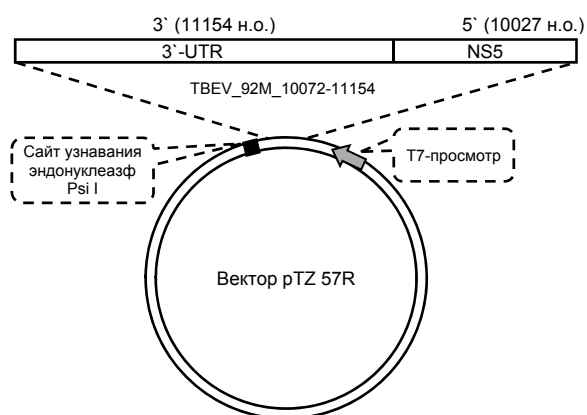


Рис. 1. Консервативная область участка кДНК ВКЭ, встроенная в плазмидный вектор pTZ 57R под промотором Т7 РНК полимеразы.

Fig. 1. The conservative region of the TBE cDNA region, integrated into the pTZ 57R plasmid vector under the T7 RNA polymerase promoter.

Для удаления матричной ДНК реакционную смесь после Т7-транскрипции обрабатывали свободной от РНКаз ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, США). После окончания инкубации для инактивации фермента использовали по 10 мкл 50 mM ЭДТА на каждый образец с последующей инкубацией при 65 °С в течение 10 минут. Полученную РНК очищали от реакционной смеси с помощью наборов «РибоПреп» (Амплисенс) и растворяли в 50 мкл буфера для разведения РНК.

Приготовление панели стандартных образцов

Концентрацию синтезированной РНК в стоковом растворе оценивали спектрофотометрически с помощью прибора NanoVue Plus (Biochrom, США). Количество копий РНК в одном микролитре раствора рассчитывали на основе известной нуклеотидной последовательности синтезированного фрагмента с помощью онлайн-калькулятора ENDMEMO (<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>). Для приготовления стандартов концентрации РНК стоковый образец разбавляли до расчётной концентрации 10⁹ копий РНК/мкл и приготавливали серийные десятикратные разведения синтетической РНК в диапазоне от 10 до 10⁹ копий РНК/мкл.

Обратная транскрипция и ПЦР

Комплементарную ДНК получали с помощью набора для обратной транскрипции Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве праймера для обратной транскрипции с матрицы +РНК использовали анти-смысловой праймер 11154R 5'-AGCGGGTGTTCCTCCG-3'. Для контроля специфичности амплификации цепей РНК были использованы смысловой праймер к -РНК 10072F 5'-GCTTGGATGACCACAGAGGAC-3', случайные гексануклеотиды и непраймированная ОТ смесь.

Количественную ПЦР проводили согласно методике M. Schwaiger и P. Cassinotti с модификациями [17]. Реакционная смесь в объёме 25 мкл содержала 1 ед. полимеразы HSTaq (Евроген, Москва), 2,5 мкл оптимизированного реакционного буфера (Евроген, Москва), 0,25 mM каждого dNTP, праймеры F-TBE1 5'-GGGCGTTCTTGTCTCC-3' и R-TBE1 5'-ACACATCACCTCCTGTCTCAGACT-3' в концентрации 50 nM и 300 nM, соответственно, а также зонд TBE-Probe-WT 5'-(FAM)TGAGCCACCATCACCCAGACACA(RTQ1)-3' в концентрации 200 nM (Синтол, Москва). Режим ПЦР включал предварительный прогрев при 95 °С в течение 10 мин с последующими 45 циклами: 95 °С – 15 с, 60 °С – 1 мин. Регистрацию результатов проводили по каналу FAM на стадии 60 °С. Циклом количественного определения (quantification cycle, Cq) считали первый цикл, при котором интенсивность флуоресцентного сигнала превышала 10 стандартных отклонений от фона. Фон составляющая учитывалась с 1-го по 10-й цикл. Расчёты выполняли с помощью программы BioRad CFX Manager v. 3.1 (Bio-Rad Laboratories Inc., США). В каждую постановку был включён отрицательный контроль, содержащий все компоненты реакции ОТ-ПЦР, за исключением матричной РНК. Реакция осуществлялась в амплификаторе C1000 Touch с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories Inc., США).

Статистическая обработка

Соответствие определения концентрации РНК линейной модели оценивали по коэффициенту детерминации R², зависимость Cq от концентрации РНК считали линейной при R² > 0,8. Для оценки вариабельности

наблюдений рассчитывали стандартное отклонение средних значений. Для оценки точности измерения количества РНК вычисляли коэффициент вариации V (в процентах) средних значений стандартной кривой после пяти независимых воспроизведений в разные дни (межтестовая точность). Эффективность ПЦР выражали в процентах и рассчитывали по формуле $\{(10^{[-1/k]} - 1) \times 100\}$, где k – угловой коэффициент (slope) стандартной кривой. Выпадающие значения концентрации РНК исключали с помощью квартильного метода [23]. Расчёты производили с помощью программы MS Office EXCEL 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Специфичность обратной транскрипции и подготовка стандартных образцов

Из всех полученных конструкций был отобран клон, содержащий вставку длиной 853 н.о. и позволяющий стабильно синтезировать РНК, с которой получался ОТ-ПЦР продукт при праймировании олигонуклеотидом 11154R. Данный праймер является обратным и комплементарным к +РНК ВКЭ, следовательно, наличие ОТ-ПЦР продукта говорит о корректной ориентации вставки относительно T7-промотора. Контрольные эксперименты со случайными олигонуклеотидами, смысловым праймером 10072F и без праймирования ОТ показали, что для достоверной оценки количества +РНК необходимо особо тщательно извлекаться от остаточных фрагментов плазмидной ДНК. Так, при однократной обработке ДНКазой I ПЦР-продукт обнаруживался даже в образце ОТ без праймеров вообще (Cq-39,8). Эта проблема была решена с помощью ряда модификаций пробоподготовки, в частности:

- 1) увеличено количество плазмидной матрицы в 10 раз на этапе T7-транскрипции *in vitro*;
- 2) на этапе обработки ДНКазой I использованы одновременно и ионы Mn^{++} , и ионы Mg^{++} ;
- 3) применена двухстадийная обработка ДНКазой I при добавлении по 40U ДНКазы I каждый час в течение двух часов инкубации;
- 4) увеличено количество ЭДТА до 10 мкл для ингибирования ДНКазы I;

5) введена дополнительная стадия выделения РНК после инактивации ДНКазы I.

После этого реакция ОТ была специфичной к +РНК ВКЭ. Концентрация синтетической РНК в стоковом образце составила 21,6 нг/мкл, что соответствует порядка 33×10^9 копий в микролитре. Это позволило приготовить стандартные образцы с расчётными концентрациями от 10^9 до 1 копии в микролитре.

Чувствительность ОТ-ПЦР

Реакция была линейной в диапазоне от 10^3 до 10^9 копий/мкл ($R^2 = 0,99$), эффективность ПЦР составила 100 % (рис. 2). При концентрациях +РНК ниже 1000 копий в 1 мкл линейность заметно нарушалась, что затрудняло количественное определение, однако качественная детекция низких количеств +РНК была осуществима. Возможно, сильное влияние на эффективность и линейность ПЦР оказывает влияние на срок хранения РНК-стандартов. Так, при использовании тех же самых стандартных образцов через 3–6 месяцев после приготовления коэффициент детерминации R^2 снижался до 0,84, а эффективность ПЦР приобретала аномальный характер и составляла 253 %, что говорит о снижении качества матричной РНК (рис. 2). В нашей предыдущей работе с использованием ДНК-стандартов коэффициент корреляции R^2 между циклом количественного определения и концентрацией стандартного образца составлял 0,99, а эффективность ПЦР составила 103 % [20], что позволяет сопоставлять новые результаты с ранее полученными результатами.

Воспроизводимость анализа

Коэффициент вариации при оценке межтестовой точности определения варьировал от 1,8 % до 3,8 % в зависимости от количества исходной матрицы и в среднем составил 2,8 %. Отмечено, что вариабельность анализа сопоставима с вариабельностью определения аналогичных концентраций РНК, приводимой в оригинальном исследовании (2,9 %; табл. 1) [17]. Однако вариабельность результатов, полученных при использовании ДНК-стандартов, была несколько меньше (табл. 1) [20]. На

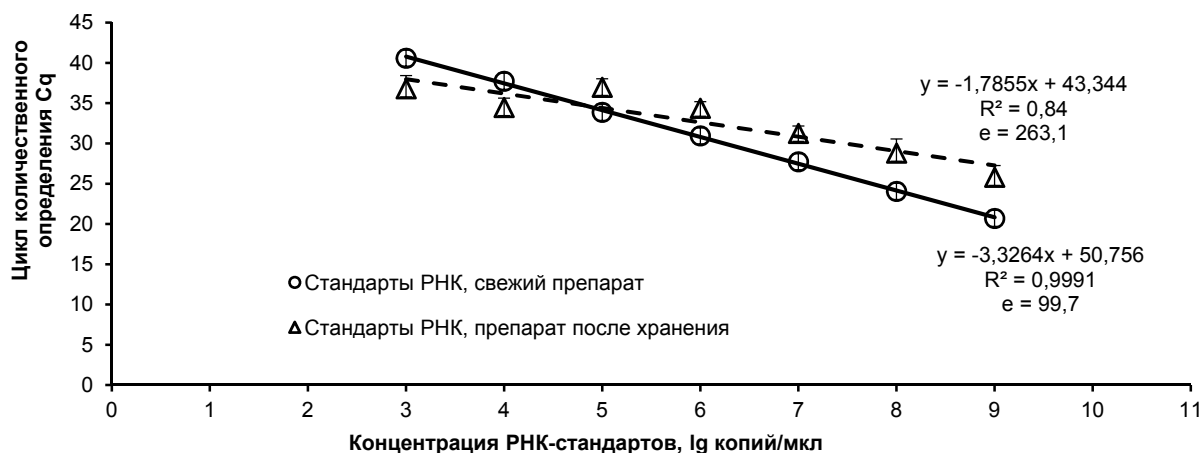


Рис. 2. Оценка линейности, эффективности и диапазона чувствительности количественной ОТ-ПЦР. По оси абсцисс приведена концентрация стандартных образцов РНК (копий/мкл), по оси ординат – цикл количественного определения (Cq). Планки погрешностей отображают стандартное отклонение по результатам пяти независимых повторов. Чёрная линия обозначает линейный тренд, уравнение линейности и коэффициент корреляции R^2 приведены в верхнем правом углу.

Fig. 2. Assessment of linearity, efficacy and sensitivity range of quantitative RT-PCR. The abscissa shows the concentration of standard RNA samples (copies / μ l), the ordinate shows the quantification cycle (Cq). Error bars display standard deviation based on five independent repetitions. The black line indicates a linear trend, the linearity equation and the correlation coefficient R^2 are shown in the upper right corner.

наш взгляд, это может быть вызвано рядом факторов, в том числе большей вариабельностью исходных образцов РНК, меньшей стабильностью РНК, по сравнению с ДНК и более сложным процессом пробоподготовки, приводящим к потерям материала на каждом этапе.

Таблица 1
Средние значения коэффициентов вариации V в разных исследованиях при оценке межтестовой вариабельности количественного определения РНК-стандартов

Table 1
The average values of the coefficient of variation in different studies during the evaluating of intertest variability of the RNA standards quantitative determination

Источник	Диапазон значений V , %	Среднее, m
Schwaiger M., Cassinotti P., 2003	2,9	2,9
Хаснатинов М.А. и др., 2018	0,2–3,1	2,2
Эта работа	1,8–3,8	2,8

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Чувствительность ПЦР позволяла определять концентрацию РНК в количестве более 10 копий/мкл. В повторных экспериментах стабильно получали предел обнаружения не менее 10^3 копий на 1 мкл раствора. В наилучшем случае обнаруживалось до 10 копий при коротком сроке хранения стандартных образцов (4–5 суток при -70°C). При более длительном хранении наблюдалось снижение чувствительности до 10^3 . Это может быть связано с более низкой стабильностью молекулы РНК. Можно сделать вывод о том, что для получения корректных данных необходимо параллельно амплифицировать максимально возможное количество тестовых образцов в одном прогоне с РНК-стандартами, чтобы исключить вероятное искажение итогового результата. Путём экспериментального подбора оптимальных условий реакции был внесён ряд изменений в методику приготовления стандартов концентрации РНК:

Таким образом, оптимизированная методика позволяет достоверно определять концентрацию геномной РНК ВКЭ и может использоваться для детального изучения репликации ВКЭ в культуре клеток позвоночных и беспозвоночных хозяев.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Шестопалов Н.В., Шашина Н.И., Германт О.М., Пакскина Н.Д., Царенко В.А., Веригина Е.В., Бойко Л.С. Информационное письмо «Природно-очаговые инфекции, возбудителей которых передают иксодовые клещи, и их неспецифическая профилактика в российской федерации (по состоянию на 01.01.2019 г.)». *Дезинфекционное дело*. 2019; 1(107): 37–44.
- Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol*. 1999; 80: 179–185. doi: 10.1099/0022-1317-80-1-179
- Козлова И.В., Демина Т.В., Ткачев С.Е., Дорошенко Е.К., Лисак О.В., Верхолина М.М., и др. Характеристика байкальского субтипа вируса клещевого энцефалита, циркулирующего на территории Восточной Сибири. *Acta biomedica scientifica*. 2018; 3(4): 53–60. doi: 10.29413/ABS.2018-3.4.9
- Dai X, Shang G, Lu S, Yang J, Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 7(1): 74. doi: 10.1038/s41426-018-0081-6

- Wallner G, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 1995; 213(1): 169–178. doi: 10.1006/viro.1995.1557
- Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Presence of poly(A) in a flavivirus: significant differences between the 3'-noncoding regions of the genomic RNAs of tick-borne encephalitis virus strains. *J Virol*. 1991; 65(8): 4070–4077.
- Wallner G, Mandl CW, Ecker M, Holzmann H, Stiasny K, Kunz C, Heinz FX. Characterization and complete genome sequences of high- and low-virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol*. 1996; 77: 1035–1042. doi: 10.1099/0022-1317-77-5-1035
- Chu PW, Westaway EG. Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology*. 1985; 140(1): 68–79. doi: 10.1016/0042-6822(85)90446-5
- Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds.). *Fields Virology, 5th Edition*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; 2007; 1101–1152.
- Иткес А.В. *Полимеразная цепная реакция*. М.: Альтекс; 1999.
- Пальцев М.А. *Введение в молекулярную медицину*. М.: Медицина; 2004.
- Carnegie PR. Quality control in the food industries with DNA technologies. *Australas Biotechnol*. 1994; 4(3): 146–149.
- De Vega M, Blanco L, Salas M. Processive proofreading and the spatial relationship between polymerase and exonuclease active sites of bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1999; 292(1): 39–51. doi: 10.1006/jmbi.1999.3052
- Dean FB, Neison JR, Giesler TL, Lasken RS. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiprimer rolling circle amplification. *Genome Res*. 2001; 11(6): 1095–1099. doi: 10.1101/gr.180501
- Lo AC, Feldman SR. Polymerase chain reaction: basic concepts and clinical applications in dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 1994; 30(2 Pt 1): 250–260. doi: 10.1016/S0190-9622(94)70025-7
- Little MC, Andrews J, Moore R, Bustos S, Jones L, Embres C, et al. Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated in a second-generation DNA probe system, BDPProbeTecET. *Clin Chem*. 1999; 45(6): 777–784.
- Schwaiger M, Cassinotti P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol*. 2003; 27(2): 136–145. doi: 10.1016/S1386-6532(02)00168-3
- Екимов А.Н., Шипулин Г.А., Бочкарев Е.Г., Юмин Д.В. Полимеразная цепная реакция в реальном времени. М.: ЦНИИ Эпидемиологии РФ; 2004. URL: <http://www.interlabservice.ru/catalog/faq?id=3422>.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996; 6(10): 986–994. doi: 10.1101/gr.6.10.986
- Хаснатинов М.А., Болотова Н.А., Миловидов К.С., Кондратов И.Г., Данчинова Г.А. Репликация РНК вируса клещевого энцефалита в новой перевиваемой линии клеток естественного хозяина *Arodemus peninsulae*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2018; 36(1): 41–45. doi: 10.18821/0208-0613-2018-36-1-41-45
- Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Злобин В.И., Ляпунов А.В., Арбатская Е.В., Чапоргина Е.А., и др. Вирус клещевого энцефалита в Монголии. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2012; 4: 9–12.
- Chung CT, Niemela SI, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *PNAS*. 1998; 86(7): 2172–2175. doi: 10.1073/pnas.86.7.2172
- Walpole RE, Myers RH, Myers SL, Ye K. *Probability & Statistics for Engineers & Scientists, 8th ed*. Upper Saddle River: Pearson Education, Inc.; 2007.

REFERENCES

1. Shestopalov NV, Shashina NI, Germant OM, Pakskina ND, Tsarenko VA, Verigina EV, et al. Information letter "Focal infection, pathogens that transmit and spread ticks, and their direct prevention in the Russian Federation (as of 01/01/2019)". *Dezinfektsionnoye delo*. 2019; 1(107): 37-44. (In Russ.)
2. Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol*. 1999; 80: 179-185. doi: 10.1099/0022-1317-80-1-179
3. Kozlova IV, Demina TV, Tkachev SE, Doroshchenko EK, Lisak OV, Verkhozina MM, et al. Characteristics of the Baikal subtype of tick-borne encephalitis viruses circulating in Eastern Siberia. *Acta biomedica scientifica*. 2018; 3(4): 53-60. doi: 10.29413/ABS.2018-3.4.9. (In Russ.)
4. Dai X, Shang G, Lu S, Yang J, Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 7(1): 74. doi: 10.1038/s41426-018-0081-6
5. Wallner G, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 1995; 213(1): 169-178. doi: 10.1006/viro.1995.1557
6. Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Presence of poly(A) in a flavivirus: significant differences between the 3'-noncoding regions of the genomic RNAs of tick-borne encephalitis virus strains. *J Virol*. 1991; 65(8): 4070-4077.
7. Wallner G, Mandl CW, Ecker M, Holzmann H, Stiasny K, Kunz C, Heinz FX. Characterization and complete genome sequences of high- and low-virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol*. 1996; 77: 1035-1042. doi: 10.1099/0022-1317-77-5-1035
8. Chu PW, Westaway EG. Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology*. 1985; 140(1): 68-79. doi: 10.1016/0042-6822(85)90446-5
9. Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds.). *Fields Virology, 5th Edition*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; 2007; 1101-1152.
10. Itkes AV. *Polymerase chain reaction*. Moscow: Al'teks; 1999. (In Russ.)
11. Paltsev MA. *Introduction to molecular medicine*. Moscow: Meditsina; 2004. (In Russ.)
12. Carnegie PR. Quality control in the food industries with DNA technologies. *Australas Biotechnol*. 1994; 4(3): 146-149.
13. De Vega M, Blanco L, Salas M. Processive proofreading and the spatial relationship between polymerase and exonuclease active sites of bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1999; 292(1): 39-51. doi: 10.1006/jmbi.1999.3052
14. Dean FB, Neison JR, Giesler TL, Lasken RS. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiprimed rolling circle amplification. *Genome Res*. 2001; 11(6): 1095-1099. doi: 10.1101/gr.180501
15. Lo AC, Feldman SR. Polymerase chain reaction: basic concepts and clinical applications in dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 1994; 30(2 Pt 1): 250-260. doi: 10.1016/S0190-9622(94)70025-7
16. Little MC, Andrews J, Moore R, Bustos S, Jones L, Embres C, et al. Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated in a second-generation DNA probe system, BDProbeTecET. *Clin Chem*. 1999; 45(6): 777-784.
17. Schwaiger M, Cassinotti P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol*. 2003; 27(2): 136-145. doi: 10.1016/S1386-6532(02)00168-3
18. Yekimov AN, Shipulin GA, Bochkarev YeG, Ryumin DV. *Real-Time PCR*. Moscow: Tsentral'nyy nauchnyy institut epidemiologii Rossiyskoy Federatsii; 2004. URL: <http://www.interlabservice.ru/catalog/faq/?id=3422>. (In Russ.)
19. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996; 6(10): 986-994. doi: 10.1101/gr.6.10.986
20. Khasnatinov MA, Bolotova NA, Milovidov KS, Kondratov IG, Danchinova GA. Replication of RNA of tick-borne encephalitis virus in new transferable cell lines of the natural host Apodemus peninsulae. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2018; 33(1): 49-54. doi: 10.3103/S0891416818010068. (In Russ.)
21. Khasnatinov MA, Danchinova GA, Zlobin VI, Lyapunov AV, Arbatskaya EV, Chaporgina EA, et al. Tick-borne encephalitis virus in Mongolia. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2012; 4: 9-12. (In Russ.)
22. Chung CT, Niemela SI, Miller RH. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *PNAS*. 1998; 86(7): 2172-2175. doi: 10.1073/pnas.86.7.2172
23. Walpole RE, Myers RH, Myers SL, Ye K. *Probability & Statistics for Engineers & Scientists, 8th ed*. Upper Saddle River: Pearson Education, Inc.; 2007.

Сведения об авторах

Ляпунова Наталья Андреевна – младший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: nataly2193@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6039-0854>

Хаснатинов Максим Анатольевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: khasnatinov@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8441-3640>

Данчинова Галина Анатольевна – доктор биологических наук, руководитель лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: dan-chin@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6705-3070>

Information about the authors

Natalya A. Liapunova – Junior Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: nataly2193@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6039-0854>

Maxim A. Khasnatinov – Cand. Sc. (Biol.), Leading Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: khasnatinov@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8441-3640>

Galina A. Danchinova – Dr. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: dan-chin@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6705-3070>

Статья получена: 07.08.2019. Статья принята: 12.09.2019. Статья опубликована: 26.10.2019.

Received: 07.08.2019. Accepted: 12.09.2019. Published: 26.10.2019.