

УДК 578.834.1

Н.В. СИВЕЦ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БОКАПАРВОВИРУСОВ, ВЫЯВЛЕННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

В ходе исследования установлены нуклеотидные последовательности полных геномов НВoV1, циркулирующих в нашей стране. Гомология последовательностей белорусских бокапарвовирусов с реверенс – штаммом ST2 (NC_007455.1) для BLR/Minsk/10/14, BLR/Minsk/11/14 и BLR/Mogilev/241/14 составила 99,7%, для вируса BLR/Gomel/285/15 составила 99,8%. Выявленные аминокислотные замены в последовательностях, кодирующих структурные и неструктурные белки НВoV1, были локализованы в функционально значимых участках генома

Ключевые слова: НВoV1, ДНК, сиквенсовая реакция, геном, аминокислотные замены.

Введение. В 2005 году в Швеции в носоглоточных мазках детей, госпитализированных с острыми респираторными инфекциями верхних и нижних дыхательных путей выявлен новый респираторный вирус – бокапарвовирус человека (НВoV1) [1, 2]. Использование метода случайного скрининга в последующих исследованиях привело к открытию в 2009 и 2010 годах новых генотипов бокапарвовируса человека: 2, 3, и 4 (НВoV2, НВoV3 и НВoV4) [3, 4, 5, 6]. В отличие от ранее описанного НВoV1, генотипы НВoV2, НВoV3 и НВoV4 были обнаружены в образцах фекалий человека. После открытия НВoV1 было опубликовано большое количество исследований и показана активная циркуляция вируса во многих странах мира, в том числе и в Республике Беларусь [7]. Секвенирование нуклеотидных последовательностей бокапарвовируса человека показало наличие трех открытых рамок считывания (ORF). Левая рамка считывания ORF1 кодирует неструктурный мультидоменный белок NS1, правая ORF2 кодирует три вирусных структурных белка VP1, VP2, VP3. Третья рамка считывания ORF3 кодирует неструктурный белок NP1. Организация генома бокапарвовируса приведена на рисунке 1 [8].

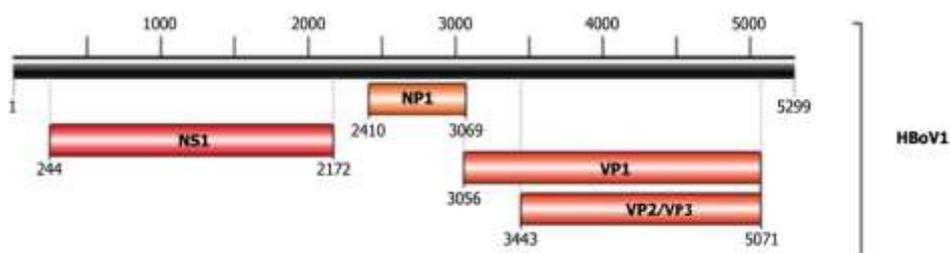


Рис. 1. Организация генома НВoV1

Неструктурный белок NS1 НВoV1 участвует в транскрипции, репликации и упаковке вирусного генома. Полная последовательность гена NS1 НВoV1 имеет длину 1928 п.н. и кодирует полипептид из 643 аминокислот с молекулярной массой 100 кДа. Наличие второго неструктурного белка NP1 является отличительной чертой рода. Длина белка может варьировать в пределах вида. У бокапарвовируса человека белок NP1 состоит из 219 аминокислот и имеет молекулярную массу 25 кДа. Белок играет важную роль в репликации вирусной ДНК, а также в процессинге вирусной пре-мРНК. Белок NP1 также необходим для генерации мРНК, кодирующей структурные белки VPs. Белки VP1 (74 кДа), VP2 (64 кДа) и VP3 (60 кДа) имеют общий С-конец. Белок VP1 содержит уникальную последовательность VP1u область размером 129 а.к. на N-конце. VP1u область является консервативной для всех парвовирусов и кодирует фермент фосфолипазу A2 (PLA2), которая необходима для модификации мембран и выхода из эндосомального/лизосомального пути во время доставки ДНК вируса в ядро, где в последующем происходит его репликация. Белок VP3 является главным структурным белком капсида и используется для типирования рода парвовирусов отвечает за формирование антигенных свойств.

В связи с отсутствием данных о генетических особенностях белорусских HBoV1 цель этой работы состояла в получении полных геномов и изучение первичной структуры вируса на нуклеотидном и аминокислотном уровне.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили назофарингеальные мазки, полученные в рамках дозорного надзора за гриппом и другими ОРВИ в соответствии с Санитарными нормами, правилами и гигиеническими нормативами «Требования к проведению эпидемиологического надзора за острыми респираторными инфекциями в Республике Беларусь» №132 от 12.10.2010 года от детей в возрасте от 0 до 18 лет госпитализированных в стационары республики в период с октября 2010 года по октябрь 2018 года. На основе реферес – последовательности (номер депонента NC_007455.1) разработали восемь пар праймеров для получения необходимого количества матрицы и проведения последующего секвенирования бокапарвовирусов, выявленных на территории нашей страны. Праймеры для амплификации полного генома HBoV1 разрабатывали с учетом наличия перекрывающихся участков, что позволило проводить качественный анализ первичной структуры генов, кодирующих белки NS1, NP1, VP1/VP2/VP3. Олигонуклеотиды, использованные для проведения амплификации представлены в таблице 1. Разработанные праймеры и зонды были синтезированы в ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь). Для выделения ДНК, РНК использовали коммерческий набор «ДНК-сорб» согласно инструкции производителя. Визуализацию продуктов амплификации проводили посредством гель-электрофореза в камере для горизонтального электрофореза multiSub Midi (Clever Scientific, Великобритания) в буферном растворе (200 мМ Трис, 100 мМ уксусная кислота, 50 мМ ЭДТА, pH 8,4) и агарозном геле 1,5%. ПЦР для накопления матриц ДНК проводили на амплификаторе MJ mini ("Bio-Rad, США) с использованием коммерческого набора «Genome Lab DTCS Quick Start Kit» (Beckman Coulter, США). Электрофорез и анализ продуктов реакции выполняли на автоматическом капиллярном ДНК - анализаторе Beckman Coulter «CEQ 8000» (Beckman Coulter, США). Сборка последовательностей их обработка осуществлялись в программном пакете Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, США).

Результаты и их обсуждение. Изучение первичной структуры генома HBoV1 проводили в несколько этапов: получение необходимого количества матрицы интересующей нас последовательности, проведение секвенсовой реакции с последующим капиллярным электрофорезом, первичный анализ полученных данных в ходе проведения секвенирования и филогенетический анализ бокапарвовирусов, выявленных на территории нашей страны. Для отработки условий амплификации использовали образцы клинического материала, в которых методом ПЦР была выявлена ДНК HBoV1. При проведении исследований отбирали образцы с низкими значениями порогового цикла (Ct), основываясь на закономерностях вычислительной математики: тем меньше значение Ct, тем больше в исследуемом образце целевой молекулы ДНК. Эмпирическим путём был определен состав реакционной смеси: 10x ПЦР буфер (750 мМ Трис-HCl, 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% Твин 20, pH 8,8) – 2,5мкл, 10мМ DNTPs – 0,5мкл, праймер (F,R) – 800нМ, 50мМ MgCl₂ – 1,5мкл, ДНК-полимераза HF – 0,5мкл, ДНК матрицы – 10мкл и вода для ПЦР – 2 мкл и отработан оптимальный режим для проведения амплификации, состоящий из следующих циклов: денатурация при 95°C – 5 мин., 95°C – 40 сек., отжиг праймеров от 52°C до 66°C – 60 сек. (для каждой пары праймеров своя температура отжига), элонгация при 72°C – 3 мин. Режим ПЦР повторяли 40 циклов, конечная элонгация 72°C – 3 мин., хранение 4°C. Визуализацию продуктов амплификации проводили посредством гель-электрофореза. Анализ электрофореграмм продуктов амплификации показал, что оптимальное накопление искомым матриц происходит в широком температурном диапазоне (рисунок 2). Каждую очищенную матрицу секвенировали в прямом и обратном направлении. Таким образом для секвенирования полного генома бокапарвовируса провели 16 секвенсовых реакций, используя следующий состав реакционной смеси: DTCS Quick Start Master Mix (8 мкл), праймер F или R 1,6мМ (2мкл), образец ДНК (5 мкл) и вода для ПЦР (5 мкл) и режим реакции (96°C – 20с, 50°C – 20с, 60°C – 4 мин), который повторяли в течении 30 циклов.

Полные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих белки NS1, NP1, VP1/VP2 удалось определить для четырёх образцов. Образцы, которые использовали в исследовании были полученных из г.Минска в 2014 году от пациентов с симптомами обструктивного бронхита (BLR/Minsk/11/14, BLR/Minsk/10/14), из г.Гомеля (2015г., BLR/Gomel/285/15) и г.Могилева (2014г., BLR/Mogilev/241/14) от пациентов с тяжелым течением острой респираторной инфекции. Последовательности бокапарвовирусов BLR/Minsk/11/14, BLR/Minsk/10/14, BLR/Gomel/285/15 и

BLR/Mogilev/241/14 были депонированы в Международную базу данных (GenBank, NCBI) с кодом доступа MF376167.1, MF376168.1, MF376169.1, MF376170.1.

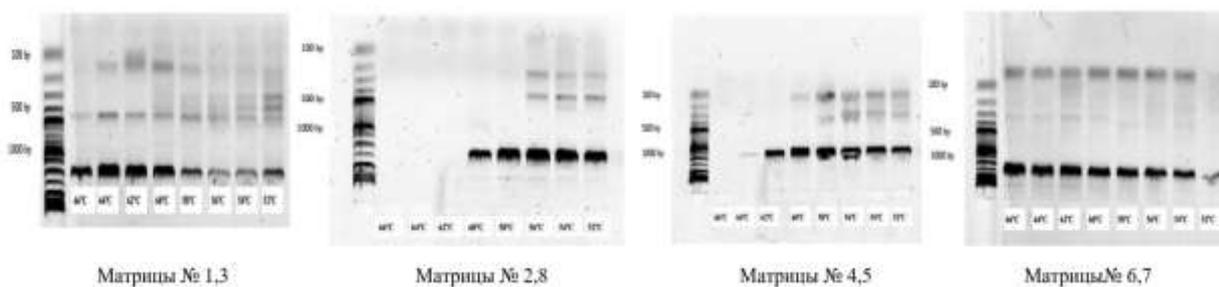


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей бокапарвовирусов, циркулирующих в нашей стране и нуклеотидных последовательностей референс-вирусов, представителей рода *Voscarparvovirus* показал, что вирусы, выявленные на территории нашей страны, принадлежат к генотипу HBoV1. Гомология последовательностей белорусских бокапарвовирусов с референс – штаммом ST2 (NC_007455.1) для BLR/Minsk/10/14, BLR/Minsk/11/14 и BLR/Mogilev/241/14 составила 99,7%, для вируса BLR/Gomel/285/15 составила 99,8%. Полученные данные свидетельствуют о достаточно высокой консервативности среди бокапарвовирусов генотипа HBoV1, не смотря на географическую удаленность изолятов. После подтверждения принадлежности наших вирусов к генотипу HBoV1 следующим этапом стало изучения филогенетических взаимоотношений наших вирусов и бокапарвовирусов генотипа HBoV1, выявленных в других странах мира. Для выполнения данной задачи использовали 51 нуклеотидную последовательность полных геномов HBoV1 размером 5029 п.н. выделенных в других странах мира в период 2010 – 2019гг., которые имели максимальные отличия от референс – штамма ST2 (NC_007455.1). Согласно данным филогенетического анализа три белорусских вируса HBoV1 BLR/Mogilev/241/14, HBoV1 BLR/Minsk/10/14, HBoV1 BLR/Minsk/11/14 образовывали отдельный кластер и показали генетическое родство с референс вирусом ST2. Бокапарвовирус BLR/Gomel/285/15 группировался с HBoV1, выявленном в Египте в 2017 году (KU557404) (Рисунок 3).

При сопоставлении аминокислотных последовательностей гена NS1, NP1, VP1/ VP2/ VP3 исследуемых бокапарвовирусов с референс – вирусом были выявлены несинонимичные нуклеотидные замены. Наибольшее число замен в гене NS1 установлено для образцов BLR/Minsk/10/14 (восемь) и BLR/Minsk/11/14 (шесть). Замена пролина (P) на серин (S) в положении 157 и замена аспартата (D) на лизин (K) в положении 639 установлена у всех четырех белорусских HBoV1 (таблица 2). Анализ локализации аминокислотных замен у изучаемых вирусов показал, что шесть из семи аминокислотных замен в белке NS1 располагались в области сайт - специфических доменов, отвечающих за эндонуклеазную и геликазную активность, а именно в позициях: P157S, N184T, F208L, C420G, Q438P, W465G. Замена аспарагиновой кислоты на глютаминовую кислоту в положении 598 белка NS1 вирусов HBoV1 BLR/Minsk/11/14 и BLR/Minsk/10/14 и замена аспарагиновой кислоты на лизин в положении 639 HBoV1 BLR/Minsk/11/14, BLR/Minsk/10/14, BLR/Mogilev/241/14, BLR/Gomel/285/15 была локализована в С-терминальной части белка NS1, которая является транскрипторным доменом и отвечает за функционирование неструктурного белка NP1. Замены аминокислот в позициях 157, 208, 420, 449, 465, 639 привели к изменению заряда в данных сайтах. Все несинонимичные аминокислотные замены белка VP1/ VP2/VP3, выявленные у белорусских респираторных бокапарвовирусов представлены в таблице 3.

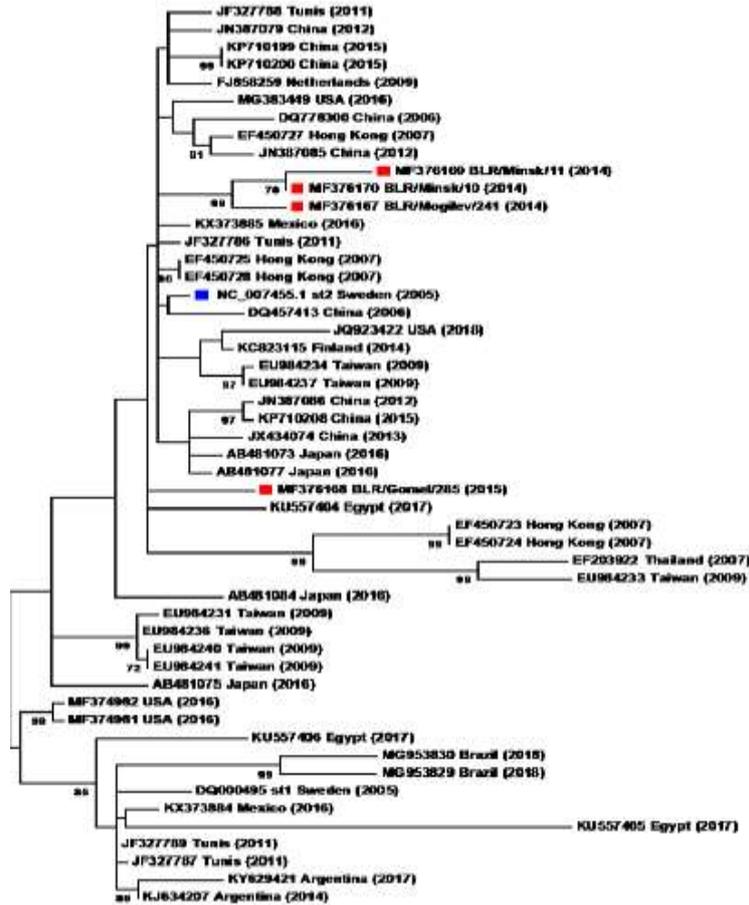


Рис. 3. Филограма построенная на основе нуклеотидных последовательностей полного генома белорусских HBoV1 и HBoV1, выявленных в других странах мира (красным цветом выделены белорусские изоляты, синим – референс – штамм HBoV1 ST2)

Три аминокислотные замены (Y244H, P295S, H568N) кроме белорусских HBoV1 были выявлены и у HBoV1 из других стран мира. Так замена Y244H выявлена у бокапарвовирусов из Гонконга 2007 года (EF450723.1, EF450724.1), замена P295S выявлена у HBoV1 из Японии 2016 года – AB481073.1, AB481074.1, AB481084.1 и Тайвани 2009 года – EU984231.1, EU984234.1, EU984236.1, EU984237.1, EU984240.1, EU984241.1, замена H568N выявлена у депонентов с номерами AB481073.1, EU984234.1 EU984237.1, AB481077.1, DQ457413.1, DQ778300.1, EF450725.1, EF450727.1, EF450728.1, FJ858259.1, JF327786.1, JF327788.1, JN387079.1, JQ923422.1, JX434074.1, KC823115.1, KP710199.1, KP710200.1, KX373885.1, MG383449.1.

Табл. 1. Олигонуклеотиды, использованные для проведения амплификации

Праймеры	Нуклеотидная последовательность праймера (5' - 3')	Позиция в геноме	T(°C) плавления	Длина ПЦР продукта	№ искомой матрицы
F1	GCCGGCAGACATATTGGATTCAA	1-24	65	737	1
R1	CCTCAGGTTCAAAAGGACGTGTA	714-737	63		
F2	AGTTGGGGGAGAAGGACTAA	609-628	58	715	2
R2	GCATGCCCAAGACTTGTCT	1305-1324	58		
F3	TGAACACTCCTTATGCTTGAAGGT	1257-1281	63	671	3
R3	AGAAGAGCTGCAATCTCAGTAGCA	1905-1928	64		
F4	ATGTTACACGCGGCTCCATFAAA	1823-1844	60	739	4
R4	TGAGCCCCGAGCCTCTCTC	2548-2562	61		
F5	GACATCGCAAGTGGACTATTGT	2277-2297	60	906	5
R5	TGATCATGTAATTGAGCAGCG C	3162-3183	60		
F6	TGGGATGATGTGTACCGTAGACACTT	2950-2975	66	774	6
R6	GTCCATGGAGTTGTGACGCAGC	3705-3724	66		
F7	CACCTTACAAAACAGAGGC	3648-3669	66	712	7

R7	TGCACTGAGCAGGCCAGGTCC	4340-4360	67		
F8	TAAGACAAAACGGAAGCACAG	4265-4286	58	1034	8
R8	TGTACAACAACAACACATTAAGAT	5275-5299	58		

Табл. 2. Аминокислотные замены в гене NS1 белорусских бокапарвовирусов

Референс и исследованные Бокапарвовирусы	Позиция аминокислоты в гене NS1							
	157	184	208	420	449	465	598	639
ST2 NC_007455.1	P	N	F	C	Q	W	D	D
BLR/Minsk/10/14	S	T	L	G	P	G	E	K
BLR/Minsk/11/14	S	N	F	G	P	G	E	K
BLR/Mogilev/241/14	S	T	L	C	Q	W	D	K
BLR/Gomel/285/15	S	N	F	C	Q	W	D	K

Табл. 3. Аминокислотные замены в генах VP1/VP2/VP3 белорусских бокапарвовирусов

Номера депонентов	Изоляты HBoV1	№ аминокислотной позиции										
		189	244	295	416	439	568	591	628	629	630	643
ST2 NC_007455.1	ST2/Sweden/2005	K	Y	P	Q	R	H	K	C	T	R	I
MF376170.1	BLR/Minsk/10/14	R	H	P	Q	R	N	K	C	T	R	I
MF376169.1	BLR/Minsk/11/14	K	H	P	E	K	N	K	C	T	R	I
MF376167.1	BLR/Mogilev/241/14	R	H	P	Q	R	N	K	C	T	R	R
MF376168.1	BLR/Gomel/285/15	K	Y	S	Q	R	H	E	S	S	G	I

Заключение. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей бокапарвовирусов, циркулирующих в нашей стране и нуклеотидных последовательностей референс -вирусов, представителей рода *Bocaparvovirus* показал, что вирусы, выявленные на территории нашей страны, принадлежат к генотипу HBoV1. Гомология последовательностей белорусских бокапарвовирусов с референс – штаммом ST2 (NC_007455.1) для BLR/Minsk/10/14, BLR/Minsk/11/14 и BLR/Mogilev/241/14 составила 99,7%, для вируса BLR/Gomel/285/15 составила 99,8%. Выявленные аминокислотные замены в последовательностях, кодирующих структурные и неструктурные белки HBoV1, были локализованы в функционально значимых участках генома возможно, данные аминокислотные замены влияют на вирулентность вируса, а также на спектр рецепторных взаимодействий и тропизм вируса, что требует дальнейшего изучения.

Литература

- [1] Allander T. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species // J. P Natl Acad Sci USA. 2001. Vol. 25
- [2] Allander T. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples // Proc Natl Acad Sci. 2005. Vol. 102
- [3] Arthur J.L. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children // PLoS Pathog. 2009. Vol. 5.
- [4] Kapoor A. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections // J. Inf. Dis. 2010. Vol. 201.
- [5] Teixeira de Sousa T. Human bocavirus 1 and 3 infections in children with acute gastroenteritis in Brazil // Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012. Vol. 107.
- [6] Hedman K. Human bocavirus—the first 5 years // Med. Virol. 2012. Vol. 22 –
- [7] Сивец Н.В. Бокапарвовирусная инфекция у детей в Республике Беларусь: молекулярно-эпидемиологические аспекты // Журнал инфектологии. 2019. Т.11. №4.
- [8] Guido M. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges // World J. Gastr. 2016. Vol.22.

N.V. SIVETS

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF BOCAPARVOVIRUSES DETECTED IN THE REPUBLIC OF BELARUS

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

Summary

The study determined the nucleotide sequences of the complete genomes of HBoV1 circulating in our country. Sequence homology of Belarusian bocaparvoviruses with reference strain ST2 (NC_007455.1) for BLR/Minsk/10/14, BLR/Minsk/11/14 and BLR/Mogilev/241/14 was 99.7%, for BLR/Gomel/ 285/15 was

99.8%. The identified amino acid substitutions in the sequences encoding structural and nonstructural proteins of HBoV1 were localized in functionally significant regions of the genome

Key words: HBoV1, DNA, sequence reaction, genome, amino acid substitutions.