

## РОЗРОБКА ЗАСОБІВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ІНДИКАЦІЇ КОРОНАВІРУСУ ТРАНСМІСИВНОГО ГАСТРОЕНТЕРИТУ СВИНЕЙ

О. Дерябін<sup>1</sup>, С. Рибалко<sup>2</sup>, С. Деревянко<sup>1</sup>, М. Архипова<sup>2</sup>, А. Головка<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

<sup>2</sup> ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб

ім. Л.В. Громашевського НАМН України»

[don.lmb@gmail.com](mailto:don.lmb@gmail.com)

У зв'язку з частими випадками емерджентних та ре-емерджентних вірусних інфекцій, більшість з яких мають значну соціальну вагу, існує нагальна потреба в розробці нових, як синтетичних, так і на основі природних компонентів (флавоноїди), препаратів з антивірусною активністю [1]. Потреба в нових противірусних препаратах постійно зростає в зв'язку з відсутністю ефективних вакцин проти багатьох інфекцій дихальних шляхів (риновірус, вірус парагрипу, аденовірус, респіраторно-синцитіальний вірус), вірусів папіломи людини і герпесвірусів, вірусу вітряної віспи, вірусу Епштейна–Барр, цитомегаловірусів, коронавірусів тощо. Пандемія, викликана 2019-nCoV (SARS-CoV-2) стимулювала пошук антикоронавірусних препаратів, тому підбір вірусної моделі (при відсутності BSL3) є надзвичайно відповідальним етапом досліджень. Проведений попередньо для наших препаратів молекулярний докінг дозволив відібрати в якості моделі коронавірусу вірус трансмісивного гастроентериту свиней (ВТГС), який належить до роду *Alphacoronavirus* [2, 3].

Мета дослідження полягала в розробці засобів молекулярно-генетичної індикації генів коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней на основі різних варіантів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Матеріали та методи. Для пошуку нуклеотидних послідовностей таргетних генів ВТГС використовували базу даних: GenBank (США) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Вирівнювання та аналіз нуклеотидних послідовностей, підбір специфічних олігонуклеотидних праймерів виконували за допомогою програми «Vector NTI v.10.0.1» (Invitrogen, США) та інструменту пошуку базового локального вирівнювання «Basic Local Alignment Search Tool» (BLAST) National Center for Biotechnology Information» (NCBI) США. Синтез олігонуклеотидних праймерів виконаний фірмою Metabion (Німеччина). Для виділення РНК використовували набір «QIAmp Viral RNA Mini Kit» (QIAGEN, Німеччина). Реакцію зворотної транскрипції виконували набором «Thermo Scientific RevertAid Premium Reverse Transcriptase» (Thermo Scientific, США). Концентрацію препаратів кДНК визначали на спектрофотометрі «Nano Drop 1000C» (США). Для ПЛР з візуалізацією продуктів методом електрофорезу були використані реагенти «AmpliTaq Gold™360 Master Mix» (Applied Biosystems, США); реакцію ампліфікації проводили на термоциклері «T1 Personal Comby» (Biometra, Німеччина). Документування результатів електрофорезу виконували за допомогою системи гель-документування «GelDoc XR Plus» (BioRad Laboratories, США). Для проведення кількісної ПЛР в режимі реального часу використовували реагенти «SYBR Green Real-Time PCR Master Mixes» (Thermo Scientific, США) та термоциклер CFX-96 (BioRad, США) по каналу FAM/SYBR. В роботі були використані штами ВТГС: D<sub>52-5</sub> (BRE<sub>79</sub>)–високопатогенний вірус для свиней усіх вікових груп в перещеплюваній моношаровій культурі клітин тестикул поросяти ST; Purdue-115 – атенуйований варіант ВТГС в культурі клітин ST. Титрування вірусу виконували методом негативних колоній під 1,35% агаровим покриттям (Difco-Vacto), а титр інфекційності виражали в БУО/мл.

Результати. При проведенні досліджень з оцінки можливої антивірусної активності препаратів одним з найбільш важливих етапів є вибір таргетних генів вірусу. При аналізі ВТГС, який проявляє тропізм до шлунково-кишкового тракту та респіраторного тракту

тварин, і враховуючи особливості його реплікації, в якості найбільш ймовірних були обрані гени, що кодують: ORF1a (репліказа 1a), ORF3b – неструктурний білок, довжиною біля 250 амінокислотних залишків, який знаходиться на тій самій мРНК, що і ORF3a і бере участь в патогенезі ВТГС (роль поки що залишається невизначеною), полімерази та спайкового (S) білку.

Для цих таргетних генів ВТГС були розроблені праймери з наступними послідовностями:

для гена S – прямий праймер dTGS-F 5'-GGCTCACCCACCTACTACCACCA-3', а зворотній dTGS-R 5'-CGTGCCAGCGRYTTCTAATG-3' (де R=A/G, Y=C/T). Розмір ампліфікованого фрагмента 261 п.н.

Для ORF1a – прямий праймер dORF1a-F 5'- GCTGGTGATGTTGAAGGTGTCT-3', а зворотній dORF1a-R 5'-ТАААСАСГАТТГТСТГГААСАС-3'. Розмір фрагмента 439 п.н.

Для ORF3b – прямий праймер dORF3b-F 5'-TACATGGCAGAGCTACACCGT-3', а зворотній dORF3b-R 5'-САТТГТГААСАССГАСТАССГ-3'. Розмір ампліфікованого фрагмента 243 п.н.

Для полімерази – прямий праймер dTGpol-R 5'-ТТСССГГАТТТТААТГГСААС-3', а зворотній dTGpol-F 5'-САСААСТССААТСТГСТГААТГ-3'. Розмір ампліфікованого фрагмента 527 п.н.

За результатами електрофорезу продуктів ПЛР, з обома штамми вірусу було отримано фрагменти ДНК з очікуваними розмірами. Специфічність праймерів була перевірена з 15 гетерологічними зразками ДНК та кДНК, в тому числі з 3 штамми коронавірусів курей і 2 штамми коронавірусів собак. Аналітичну чутливість розроблених праймерів визначали в кількісному варіанті ПЛР-РЧ з праймерами до генів полімерази та реплікази 1a, для чого були приготовлені серії послідовних 10-кратних розведень кДНК. Аналітична чутливість для пар праймерів dORF1a-F/dORF1a-R та dTGpol-R/dTGpol-F в ПЛР-РЧ з SYBR Green I складала 5 пкг кДНК на зразок.

Висновок. Розроблені засоби молекулярно-генетичної індикації 4 генів коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней як модельного вірусу для пошуку та аналізу нових противірусних препаратів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дерябин О.Н., Завелевич М.П., Старосила Д.Б., Пальчиковская Л.И., Платонов М.О., Атаманюк В.П., Рыбалко С.Л. Природные полифенолы как ингибиторы взаимодействия коронавируса с клетками: обзор литературы и экспериментальные данные // Укр.Мед.Часопис. – 3(137), Т.1-V/VI 2020. – С. 1-6.
2. Rybalko S., Demchenko O., Starosyla D., Deriabin O., Rudenko L., Shcherbakov O., Babenko L., Bubnov R., Spivak M. Nanoceria can inhibit the reproduction of Transmissible Gastroenteritis Virus: consideration for use to prevent and treat coronavirus disease // Мікробіол. журн. – 2021. – Т. 83, № 5. – С. 67-75.
3. Rybalko S., Starosyla D., Zaika L., Bolsunova O., Potopalskyi A., Zadorozhnyi B., Arkhipova M., Deriabin O., Zavelevich M. Izatizon Efficacy against Coronavirus Infection in Model of Transmissible Gastroenteritis Virus of Pigs // IOSR Journal Of Pharmacy And Biological Sciences. – Volume 16. Issue 5 Ser. III (Sep.–Oct. 2021). – P. 36-399.