

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-130

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ АРМИРОВАННОЙ РНК НА ПРИМЕРЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА ДЛЯ ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ

DEVELOPMENT OF A TECHNIQUE FOR OBTAINING REINFORCED RNA USING THE EXAMPLE OF A POSITIVE CONTROL SAMPLE FOR A PCR TEST SYSTEM

И. А. Смирнова, Г. В. Тымбур, Е. В. Растворгueva, Д. А. Викторов

Ульяновский государственный университет

I. A. Smirnova, G. V. Tymbur, E. V. Rastorgueva, D. A. Viktorov

Ulyanovsk State University

✉ inna.smirnova.01@bk.ru

Аннотация

Армированная РНК, как устойчивый положительный контрольный образец (ПКО), позволяет повысить качество исследований при постановке ОТ-ПЦР благодаря снижению количества ложноотрицательных результатов. Упаковка РНК в капсид фага MS2 увеличивает устойчивость целевого фрагмента к действию нуклеаз, это позволяет создавать стабильные ПКО для ОТ-ПЦР-тест-систем.

Abstract

Armored RNA, as a stable positive control sample (PCS), makes it possible to improve the quality of RT-PCR studies by reducing the number of false negative results. The packaging of RNA in the capsid of the MS2 phage increases the resistance of the target fragment to the action of nucleases, which makes it possible to create stable PCS for RT-PCR test systems.

Постановка ПЦР для диагностики заболеваний требует ПКО, содержащего стабильную мишень. В случае выявления РНК-мишеней ПКО также должен представлять собой РНК-мишень. В настоящее время наиболее актуально использование в качестве ПКО генно-инженерных продуктов. С помощью генной инженерии можно получать ПКО с заданными свойствами, которые будут более устойчивы к действию нуклеаз, такие как армированная РНК.

Армированная РНК — это разновидность неинфекционной рекомбинантной вирусоподобной частицы (ВПЧ), содержащей целевую экзогенную РНК. Она является наиболее подходящим кандидатом для ПКО или стандарта для количественного определения РНК-вирусов, поскольку устойчива к РНКазам, стабильная и неинфекционная. Такие конструкции можно получить при помощи бактериофагов, способных заражать бактерии (например, *Escherichia coli*). Полученная таким методом, инкапсулированная в ВПЧ РНК устойчива к расщеплению нуклеазами, стабильна при транспортировке и длительном хранении [1, 2].

Технология получения армированной РНК позволяет любой экзогенной РНК допустимого размера быть интегрированной через *pac*-участок генома бактериофага MS2 [3, 4]. Впоследствии такая армированная РНК может использоваться для диагностики вирусной РНК при помощи ОТ-ПЦР, в качестве положительного контроля и стандарта.

Мы в своей работе планируем опираться на технологию упаковки армированной РНК с помощью двух плазмид (см. рисунок). На одном плазмидном векторе — гены матуразы и белка оболочки, из второго будет транскрибироваться целевая РНК-последовательность вместе с *pac*-сайтом, способствующим упаковке целевого фрагмента РНК в оболочку фага MS2 [5]. Для увеличения стабильности структуры и повышения аффинности белка оболочки фага MS2 к целевому фрагменту РНК ВИЧ будет использоваться сайт *pac* с модификацией U-5 на C-5 [2]. Присутствие матуразы обеспечивает защиту целостности РНК от рибонуклеаз, а также взаимодействует с РНК, обеспечивает стабилизацию структуры [4]. Котрансформация плазмид будет происходить в штамме *E. coli* BL21. Запуск экспрессии промотором T7 реализуется добавлением ИПТГ (изопропил β -D-1-тиогалактопиранозида) в культуру клеток [6]. Даная система упаковки позволит получать только целевые последовательности РНК без частей генома MS2.

Целью работы является разработка векторных конструкций для эффективной наработки армированных РНК, применимых в диагностике ВИЧ. Планируется, что после успешной упаковки целевого фрагмента

РНК ВИЧ в капсид фага MS2 данная система будет использоваться для изготовления стабильных РНК ПКО для ОТ-ПЦР-тест-систем для выявления РНК ВИЧ.

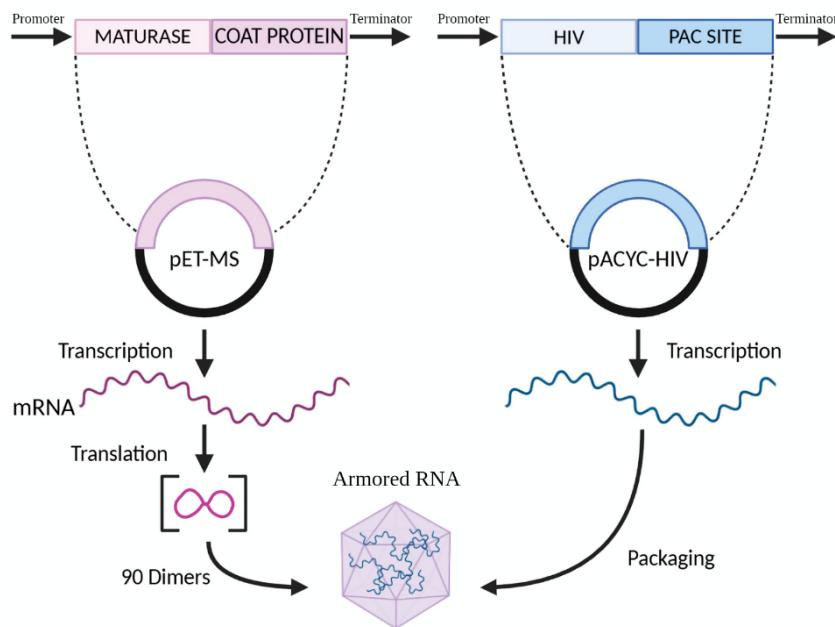


Схема получения армированной РНК с использованием двухплазмидной системы упаковки (создано в BioRender)

Литература

1. Eveleigh D., Lloyd M., Hui F. Using Armored RNA®/DNA as reliable molecular controls in infectious disease testing and beyond // Clinical Virology Symposium. Asuragen, Inc., Austin, TX. 2019.
2. Naskalska A., Heddle J. G. Virus-like particles derived from bacteriophage MS2 as antigen scaffolds and RNA protective shells // Nanomedicine (Lond.). 2024. Vol. 19, No. 12. P. 1103–1115.
3. Crone M. A., Freemont P. S. Simple low-cost production of DNA MS2 virus-like particles as molecular diagnostic controls // GEN Biotechnology. 2022. Vol. 1 (6). P. 496–503.
4. Gholami M. et al. Preparation and evaluation of ribonuclease-resistant viral HIV RNA standards based on armored RNA technology // Iranian Biomedical Journal. 2018. Vol. 22 (6). P. 394–400.
5. Mikel P. et al. Methods for preparation of MS2 phage-like particles and their utilization as process control viruses in RT-PCR and qRT-PCR detection of RNA viruses from food matrices and clinical specimens // Food and Environmental Virology. 2015. Vol. 7 (2). P. 96–111.
6. Gholami M. et al. Design and development of a quantitative TaqMan real-time PCR assay for evaluation of HIV-1 (group M) viral load in plasma using armored RNA standard // Clin. Lab. 2018. Vol. 64 (6). P. 955–963.