

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/277325187>

[Perspective method of samples purification for viromes research]

Article · January 2014

CITATIONS

0

READS

45

6 authors, including:



Evgenii Rubalskii

Hannover Medical School

43 PUBLICATIONS 189 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Claude P Muller

LIH Luxembourg Institute of Health

538 PUBLICATIONS 11,671 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Judith M Hübschen

LIH Luxembourg Institute of Health

207 PUBLICATIONS 2,588 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Measles Virus Neutralization [View project](#)



Hepatitis B and Delta in Central African Republic [View project](#)

УДК 57.088:578.5

ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ОЧИСТКИ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ВИРОМОВ

© Рубальский Е.О.¹, Тихонова Н.Т.¹, Алешкин В.А.¹, Мюллер К.П.², Хюбшен Ю.М.², Чикобава М.Г.³

¹ Лаборатория прикладной иммунохимии Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва;

² Департамент иммунологии Государственного исследовательского центра здравоохранения, Люксембург, Великое Герцогство Люксембург; ³ Научно-исследовательский центр молекулярной диагностики и биотехнологии Сухумского государственного университета, Тбилиси, Грузия
E-mail: e.o.rubalsky@gmail.com

Метагеномные исследования вирусного сообщества (вирома) в настоящее время являются одним из наиболее динамично развивающихся подходов для обнаружения редких, измененных и открытия ранее неизвестных вирусов. В таких исследованиях широко применяются методы высокопроизводительного секвенирования. Важным фактором, лимитирующим метагеномные исследования вирусов, является наличие в анализируемых образцах свободных от клеток (cell-free) эукариотических и прокариотических нуклеиновых кислот (НК), размер которых намного больше вирусных НК. Известные методы удаления невирусных НК или обогащения (концентрирования) вирусных частиц требуют сравнительно большого количества исходного материала, недостаточно универсальны или непригодны для образцов, содержащих частично деградированные вирионы. Разработанный нами метод лишен этих недостатков и позволяет осуществить универсальную очистку образцов, потенциально содержащих вирусные частицы, от свободных НК, по меньшей мере, в 4 раза.

Ключевые слова: метагеномные исследования, высокопроизводительное секвенирование, виром, очистка образцов, вирусные частицы.

PERSPECTIVE METHOD OF SAMPLES PURIFICATION FOR VIROMES RESEARCH

Rubalskii E.O.¹, Tikhonova N.T.¹, Aleshkin V.A.¹, Muller C.P.², Hübschen J.M.², Chikobava M.G.³

¹ Laboratory of Applied Immunochemistry

of G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow;

² Department of Immunology of Centre de Recherche Public de la Santé, Luxembourg, Grand Duchy of Luxembourg;

³ Research Center for Molecular Diagnostics and Biotechnology of Sukhumi State University, Tbilisi, Georgia

Metagenomic researches of viral communities (viromes) are currently one of the most dynamically developing approaches for the detection of rare, mutant and discoveries of previously unknown viruses. High-throughput sequencing methods are widely used in such researches. An important factor limiting metagenomic researches of viruses is a presence in analyzed samples cell-free eukaryotic and prokaryotic nucleic acids (NA), the size of which is much more than viral NA. The known methods for non-viral NA depletion or viral particles enrichment (concentration) require a relatively large amount of input material, are insufficiently universal and not suitable for samples containing partially degraded virions. Our method does not have these disadvantages and allows the universal purification from free NA for samples potentially containing viral particles at least 4 times.

Keywords: metagenomic research, high-throughput sequencing, virome, sample purification, viral particles.

Метагеномные исследования вирусного сообщества (вирома) в настоящее время являются одним из наиболее динамично развивающихся подходов для обнаружения редких, измененных и открытия ранее неизвестных вирусов. В таких исследованиях широко применяются методы массового параллельного секвенирования [12, 16]. Массивное параллельное секвенирование, именуемое также секвенированием следующего поколения (next generation sequencing – NGS), обеспечивает высокопроизводительный анализ ДНК и РНК. Для проведения метагеномных исследований методами NGS выделенные из клинического образца или образца окружающей среды нуклеиновые кислоты (НК) фрагментируют случайным образом (чаще всего ферментативно или ультразвуком) и далее секвенируют фракцию фрагмен-

тов необходимой длины. Таким образом происходит секвенирование НК независимо от их последовательности [1, 16]. Данный подход имеет большие перспективы и начинает использоваться в диагностике инфекционных заболеваний человека и эпидемиологическом надзоре [1, 2].

Важным фактором, лимитирующим метагеномные исследования, является наличие в анализируемых образцах клеток эукариот или прокариот, которые обычно удаляются путем микрофилтрации. Однако после этой очистки в образце могут в значительной концентрации остаться свободные от клеток (cell-free) эукариотические и прокариотические НК, размер которых намного больше вирусных НК [6, 17, 18, 19]. Такая естественная «контаминация» образцов существенно снижает эффективность виромных исследований,

так как сенсорные единицы секвенаторов (полупроводниковые микрофлюидные чипы, микрофлюидные проточные ячейки и другие) предназначены для одноразового использования и имеют определенную производительность, ограниченную, в том числе, количеством считываемых фрагментов ДНК. Поэтому для повышения эффективности метагеномных исследований вирома используют различные методы удаления невирусных нуклеиновых кислот или обогащения (концентрирования) вирусных частиц. Для таких целей применяют ультрафильтрацию, ультрацентрифугирование в градиенте плотности, обработку ДНКазми и РНКазми, пропускание через вещества, аффинные к удаляемым нежелательным НК [2, 6, 9, 20].

Однако, как показали проведенные нами исследования, данные методы или требуют сравнительно большого количества исходного материала, или недостаточно универсальны, или непригодны для образцов, содержащих частично деградированные вирусные частицы. Поэтому их применение в рутинных исследованиях малоэффективно, например, когда в качестве клинического образца используется сыворотка крови.

С учетом этих недостатков нами была поставлена цель: разработать метод универсальной очистки образца исходным объемом 500 мкл и выше от свободных НК для последующего тотального выделения вирусных НК, предназначенных для метагеномных исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы. Для оценки разработанного метода нами были использованы образцы сыворотки

крови здоровых добровольцев. В каждый образец сыворотки вносили культуры вируса кори, гриппа и аденовируса в концентрациях, близких к клиническим образцам (1.9×10^2 копий/мкл, 1.9×10^3 копий/мкл, 1.6×10^3 копий/мкл соответственно).

Выделение нуклеиновых кислот. Тотальное выделение НК из очищенных образцов проводили при помощи набора QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN, США) согласно инструкции производителя.

Реакции обратной транскрипции (ОТ) и количественные ПЦР в реальном времени. Контроль сохранности вирусных частиц и оценку эффективности очистки образцов от свободных НК человека проводили при помощи следующих реакций:

- реакция ОТ к РНКазе Р человека с последующей количественной ПЦР в реальном времени;
- количественная ПЦР в реальном времени к гену рибосомального белка L30 человека;
- реакция ОТ к РНК вируса кори с последующей количественной ПЦР в реальном времени;
- реакция ОТ к РНК вируса гриппа типа А с последующей количественной ПЦР в реальном времени;
- количественная ПЦР в реальном времени к ДНК аденовируса.

Реакции ОТ с последующей количественной ПЦР в реальном времени проводили при помощи набора OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, США). Количественные ПЦР в реальном времени проводили при помощи набора Platinum Taq DNA Polymerase (Life Technologies, США). Для проведения реакций использовали олигонуклеотидные последовательности, приведенные в таблице 1.

Таблица 1

Олигонуклеотидные последовательности для контроля метода очистки вирусных частиц

Название мишени	Назначение олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Источник литературы
РНКазы Р человека	Прямой праймер	aga ttg gga cct gcg agc g	[4]
	Обратный праймер	gag cgg ctg tct cca caa gt	
	ПЦР-зонд	FAM-ttc tga cct gaa ggc tct gcg cg-BHQ1	
рибосомальный белок L30 человека	Прямой праймер	gcc cgt tca gtc tct tcg att	[14]
	Обратный праймер	caa ggc aaa gcg aaa ttg gt	
РНК вируса кори	Прямой праймер	ccc tga ggg att caa cat gat tct	[10]
	Обратный праймер	atc cac ctt ctt agc tcc gaa tc	
	ПЦР-зонд	FAM-tct tgc tcg caa agg cgg tta cgg-BHQ1	
РНК вируса гриппа типа А	Прямой праймер	aag acc aat cct gtc acc tct ga	[24]
	Обратный праймер	caa agc gtc tac gct gca gtc	
	ПЦР-зонд	FAM-ttt gtg ttc acg ctc acc gtg cc-TAMRA	
ДНК аденовируса	Прямой праймер	gcc acs gtg ggg tty cta aac tt	[11]
	Обратный праймер	gcc sca gtg gkc dta cat gca cat c	
	ПЦР-зонд	FAM-tgc acc aga ccc ggg ctc agg tac tcc ga-TAMRA	

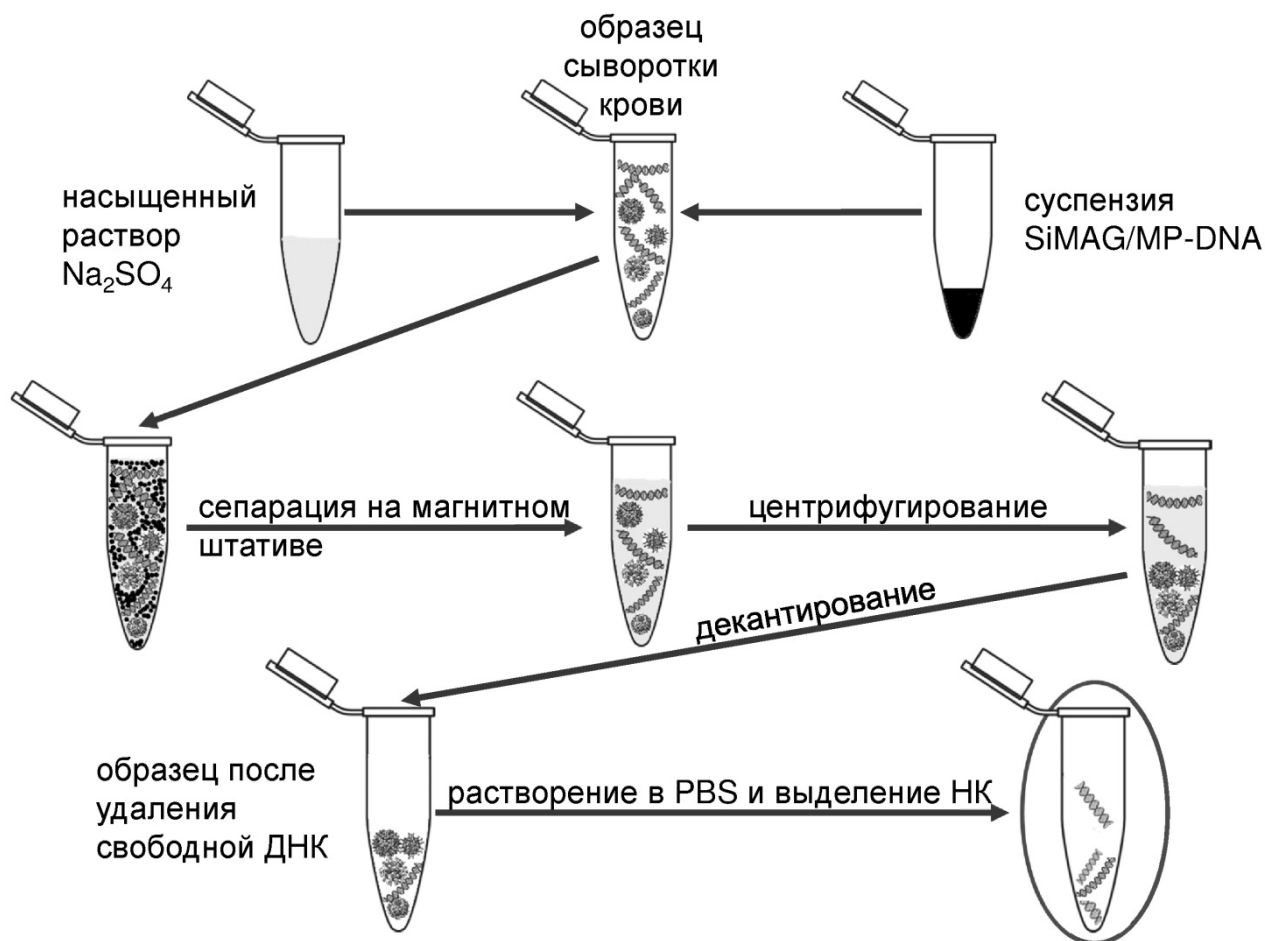


Рис. 1. Схема очистки от свободных нуклеиновых кислот образца сыворотки крови с внесенными вирусами.

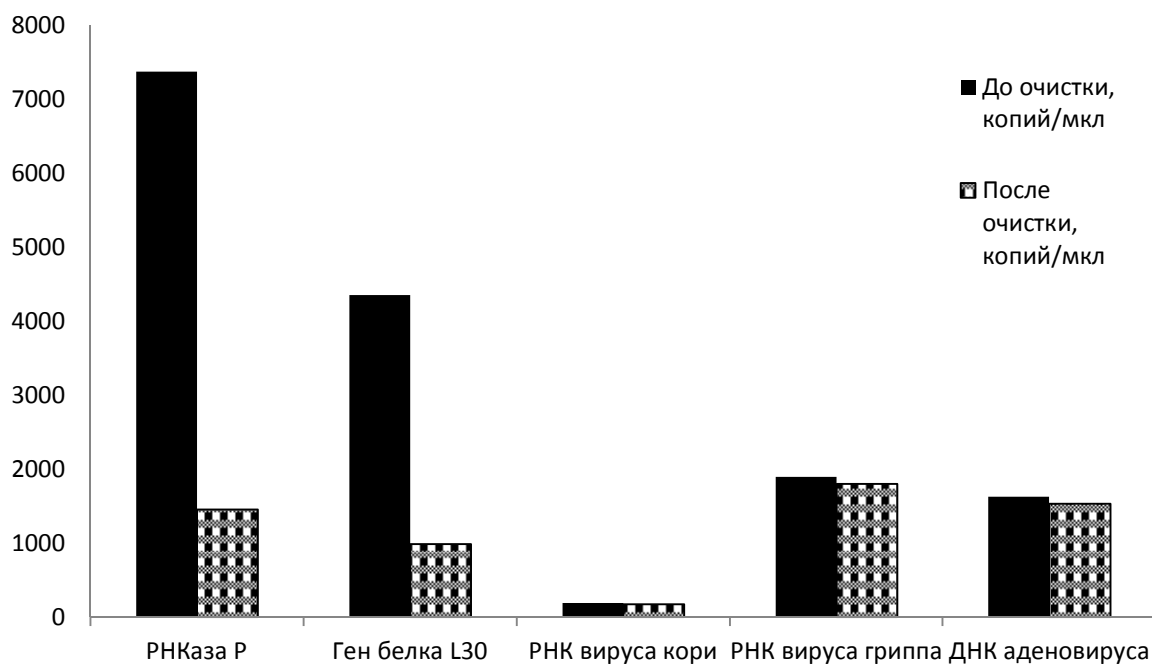


Рис. 2. Результаты количественных ПЦР к гену рибосомального белка L30, ДНК аденовируса и ОТ-ПЦР к РНКазе Р человека, РНК вирусов кори и гриппа. На графиках показаны средние данные трехкратных повторов очистки вирусных частиц ($p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанный нами метод очистки образцов заключался в следующем. В микропробирки объемом 2.0 мл вносили по 100 мкл суспензии SiMAG/MP-DNA (Chemicell GmbH, Германия), которые представляют собой магнитные частицы, имеющие на поверхности группы -Si-OH. Микропробирки ставили на магнитный штатив на 1 минуту, после чего из них удаляли жидкую фазу. Затем микропробирки переставляли в обычный штатив и добавляли в них по 500 мкл сыворотки с внесенными вирусами и 1000 мкл насыщенного раствора сульфата натрия (Na_2SO_4). Полученную смесь перемешивали на вортексе через каждые 5 минут в течение 15 минут инкубирования при комнатной температуре. Потом микропробирки ставили на 3-5 минут в магнитный штатив, после чего жидкую фазу переносили в чистые микропробирки и центрифугировали при ускорении $10\,000\times g$ в течение 15 минут. Полученный супернатант декантировали, а осадок растворяли в 500 мкл натрий-фосфатного буфера (PBS). При наличии в полученном растворе магнитных частиц микропробирку снова ставили на 1-2 минуты на магнитный штатив, после чего жидкую фазу, содержащую очищенные вирусные частицы, переносили в чистую микропробирку для последующего выделения нуклеиновых кислот.

Схематично процесс очистки образца сыворотки крови с внесенными вирусами представлен на рисунке 1.

Для уменьшения затрат на оптимизацию очистки образцов контроль ее эффективности осуществляли путем подсчета количества копий целевых нуклеиновых кислот в количественных ПЦР и ОТ-ПЦР. Результаты данного контроля представлены на рисунке 2.

Содержание РНКазы Р и ДНК гена рибосомального белка L30 после очистки снижалось в 5.06 и 4.42 раза, соответственно, по сравнению с исходным уровнем. Вместе с этим мы не наблюдали аналогичного снижения количества вирусных НК.

Известные методы очистки вирусных частиц хорошо себя зарекомендовали при многих метагеномных исследованиях. Однако они мало пригодны для исследований вирома образцов, имеющих малый объем в сочетании со сравнительно низкой концентрацией вирусных частиц и наличием свободных от клеток невирусных НК.

У здоровых лиц в сыворотке и плазме крови содержится в среднем 1.8-35 нг/мл ДНК и 2.5 нг/мл РНК. Основными источниками данных нуклеиновых кислот в крови являются процессы

апоптоза и образование комплексов нуклеиновых кислот с липопротеинами [7].

В биологических жидкостях человека свободная от клеток ДНК представлена в виде свободных молекул, в виде молекул, связанных с белками (гистонами, транспортными белками сыворотки крови, анти-ДНК антителами), а также внутри внеклеточных везикул, таких как апоптозные тельца [13, 15, 23]. Свободная от клеток РНК находится преимущественно в апоптозных тельцах, экзосомах, микровезикулах, а также в виде комплексов с белками и липопротеинами [5, 22, 25]. На это указывает, например, исследование стабильности эндогенной и искусственно внесенной РНК в образцах крови, плазмы и сыворотки. Более 99% искусственно внесенной РНК деградирует уже через 15 с инкубации, в то время как эндогенная свободная от клеток РНК остается стабильной в течение суток при прочих равных условиях [21].

Апоптозные тельца представляют собой везикулы размером 1000-5000 нм [8, 22], что позволяет избавиться от них при помощи центрифугирования и микрофльтрации. Размеры микровезикул (20 – 1000 нм) [8, 22] позволяют частично от них избавиться путем микрофльтрации. В то же время размеры экзосом составляют 30-100 нм [8, 22], что является препятствием для их фльтрации, так как одновременно могут быть отфильтрованы и некоторые вирусные частицы.

Разработанный нами метод очистки основан на депротеинизации нуклеиновых кислот (преимущественно нуклеосом), свободных от клеток и внеклеточных везикул, с последующей преципитацией белковых структур, включающих неповрежденные вирионы, и сорбцией свободных нуклеиновых кислот на магнитных частицах, имеющих на поверхности группы -Si-OH, в насыщенном растворе соли. Для этого использовали насыщенный раствор сульфата натрия.

Такой выбор обусловлен, во-первых, тем, что он обладает нейтральным рН, а значит, механизм высаливания преимущественно основан на сжатии двойного электрического слоя осаждаемых частиц. Применение растворов солей с рН, отличным от нейтрального, может являться дополнительным фактором флокуляции, но действующим только на частицы с соответствующим зарядом. Например, известен метод преципитации экзосом за счет нейтрализации их отрицательного заряда в 0.1 М растворе ацетата натрия с рН 4.75 [3]. Во-вторых, согласно лиотропному ряду эффективность высаливания с использованием сульфат-ионов выше, чем при использовании моновалентных анионов.

Для контроля эффективности очистки в качестве мишеней количественной ПЦР мы выбрали

гены РНКазы Р и рибосомального белка L30, являющихся однокопийными. Кроме того, учитывая, что РНКазы Р является рибонуклеопротеином, мы дополнительно проводили реакцию обратной транскрипции к рибонуклеиновой составляющей этого фермента для учета количества продукта гена.

Разработанный нами метод, апробированный на образцах, моделирующих образцы клинического материала, позволяет осуществить универсальную очистку образцов, потенциально содержащих вирусные частицы, от свободных НК, по меньшей мере в 4 раза. При этом концентрация вирусных частиц после очистки уменьшается незначительно. Это небольшое снижение количества копий вирусных НК можно объяснить наличием в образцах сильно поврежденных вирионов и их свободных нуклеиновых кислот.

Для валидации разработанного метода целесообразно провести метагеномное исследование клинических образцов, содержащих вирусные частицы. Несмотря на то, что данный метод апробирован на образцах сыворотки крови, его можно оптимизировать и для других типов образцов, в том числе содержащих клетки эукариот и прокариот. В данном случае необходимо сочетание разработанного метода с микрофильтрацией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф. Возможности и перспективы применения методов массивного параллельного секвенирования в диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями // Журнал «Медиаль». – 2014. – Том 12, № 2 – С. 6-28.
2. Barzon L., Lavezzo E., Militello V., Toppo S., Palù G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – Vol. 12, N 11. – P. 7861-7884.
3. Brownlee Z., Lynn K.D., Thorpe P.E., Schroit A.J. A novel "salting-out" procedure for the isolation of tumor-derived exosomes // Journal of Immunological Methods. – 2014. – Vol. 407. – P. 120-126.
4. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1) [Электронный ресурс] // World Health Organization. – 2009. – 7 p. – Режим доступа: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf?ua=1, свободный (04.09.2014).
5. Crescitelli R., Lässer C., Szabó T.G., Kittel A., Eldh M., Dianzani I., Buzás E.I., Lötvall J. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes [Электронный ресурс] // Journal of Extracellular Vesicles. – 2013. – Vol. 2. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v2i0.20677>, свободный (04.09.2014).
6. Firth C., Lipkin W.I. The genomics of emerging pathogens // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. – 2013. Vol. 14. – P. 281–300.
7. Gahan P.B. Circulating Nucleic Acids in Plasma & Serum [Электронный ресурс] // Asian Hospital & Healthcare Management. – Режим доступа: http://www.asianhbm.com/medical_sciences/circulating-nucleic-acids-plasma-serum.htm, свободный (04.09.2014).
8. György B., Szabó T.G., Pásztói M., Pál Z., Misják P., Aradi B., László V., Pállinger E., Pap E., Kittel A., Nagy G., Falus A., Buzás E.I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles // Cell. Mol. Life Sci. – 2011. – Vol. 68, N 16. – P. 2667-2688.
9. Hall R.J., Wang J., Todd A.K., Bissielo A.B., Yen S., Strydom H., Moore N.E., Ren X., Huang Q.S., Carter P.E., Peacey M. Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery // J. Virol. Methods. – 2014. – Vol. 195. – P. 194–204.
10. Hübschen J.M., Kremer J.R., De Landtsheer S., Muller C.P. A multiplex TaqMan PCR assay for the detection of measles and rubella virus // J. Virol. Methods. – 2008. – Vol. 149, N 2. – P. 246-250.
11. Jeulin H., Salmon A., Bordigoni P., Venard V. Comparison of in-house Real-Time quantitative PCR to the adenovirus R-Gene kit for determination of adenovirus load in clinical samples // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48, N 9. – P. 3132-3137.
12. Lecuit M., Eliot M. The human virome: new tools and concepts // Trends Microbiol. – 2013. – Vol. 21, N 10. – P. 510-515
13. Luger K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes // Curr. Opin. Genet. Dev. – 2003. – Vol. 13. – P. 127-135.
14. Method for enriching methylated CpG sequences : пат. 8367331 США, МПК С 12 Q 1/68 / George R. Feehery, Sriharsa Pradhan. – N 12/608489 ; заявлено 29.10.09 ; опубли. 05.02.13. – 33 с.
15. Peters D.L., Pretorius P.J. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA – a new paradigm in genetic behavior // Clin. Chim. Acta. – 2011. – Vol. 412. – P. 806-811.
16. Radford A.D., Chapman D., Dixon L., Chantrey J, Darby A.C., Hall N. Application of next-generation sequencing technologies in virology // J. Gen. Virol. – 2012. – Vol. 93, N 9. – P. 1853-1868.
17. Sharma V.K., Vouros P., Glick J. Mass spectrometric based analysis, characterization and applications of circulating cell free DNA isolated from human body fluids // Int. J. Mass. Spectrom. – 2011. – Vol. 304, N 2-3. – P. 172-183.
18. Spisák S, Solymosi N, Ittész P, Bodor A, Kondor D, Vattay G, Barták B.K., Sipos F., Galamb O., Tulassay Z., Szállási Z., Rasmussen S., Sicheritz-Ponten T., Brunak S., Molnár B., Csabai I. Complete genes may pass from food to human blood [Электронный ресурс] // PLoS ONE – 2013. – Vol. 8, N 7 – 11 p. – Режим доступа: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0069805>, свободный (04.09.2014).

19. *Swarup V., Rajeswari M.R.* Circulating (cell-free) nucleic acids – a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases // *FEBS Lett.* – 2007. – Vol. 581, N 5. – P. 795–799.
20. *Thurber R.V., Haynes M., Breitbart M., Wegley L., Rohwer F.* Laboratory procedures to generate viral metagenomes // *Nat. Protoc.* – 2009. – Vol. 4, N 4. – P. 470–483.
21. *Tsui N.B., Ng E.K., Lo Y.M.* Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma // *Clin. Chem.* – 2002. – Vol. 48, N 10. – P. 1647-1653.
22. *van der Pol E., Böing A.N., Harrison P., Sturk A., Nieuwland R.* Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles // *Pharmacological Reviews.* – 2012. – Vol. 64, N 3. – P. 676-705.
23. *van der Vaart M., Pretorius P.J.* Circulating DNA. Its origin and fluctuation // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 1137. – P. 18-26.
24. WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans – revised [Электронный ресурс] // World Health Organization. – 2009. – 49 p. – Режим доступа: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf, свободный (04.09.2014).
25. *Witwer K.W., Buzás E.I., Bemis L.T., Bora A., Lässer C., Lötvall J., Nolte-’t Hoen E.N., Piper M.G., Sivarman S., Skog J., Théry C., Wauben M.H., Hochberg F.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research [Электронный ресурс] // *Journal of Extracellular Vesicles.* – 2013. – Vol. 2. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>, свободный (04.09.2014).