



#### Применение метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для генотипирования вируса Чикунгунья

Климович О.В., Игнатъев Г.М.,  
Оксанич А.С., Каа К.В., Красько А.Г.

Лихорадка Чикунгунья представляет собой острое инфекционное заболевание, которое вызывается вирусом Чикунгунья (ЧИКВ) и распространяется комарами. ЧИКВ относят к роду *Alphavirus*, семейству *Togaviridae* и делят на четыре генотипа, а именно – Азиатский (Asian), Западно-Африканский (WAF), Восточно-Центральный Южно- Африканский (ECSA) и Восточно-Центральный Южно-Африканский - линия Индийского океана (ECSA-IOL). Генотипирование ЧИКВ проводится с помощью секвенирования участков генов белков E1, E2, nsP1 или секвенирования всего генома вируса. Метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) для генотипирования ЧИКВ ранее не использовался.



Рисунок 1. Распространенность Лихорадки Чикунгунья в мире

**Материалы и методы.** В экспериментальном исследовании использовали РНК штаммов ЧИКВ всех генотипов, ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией и анализом длин рестрикционных фрагментов.

**Цель исследования** – изучение возможности применения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для идентификации и генотипирования вируса Чикунгунья.

**Результаты.** Установлено, что фрагмент гена nsP2 длиной 648 п.о. между позициями 3806 и 4453 содержит сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, наличие или отсутствие которых составляют различные комбинации и специфично для каждого из 4-х генотипов ЧИКВ.

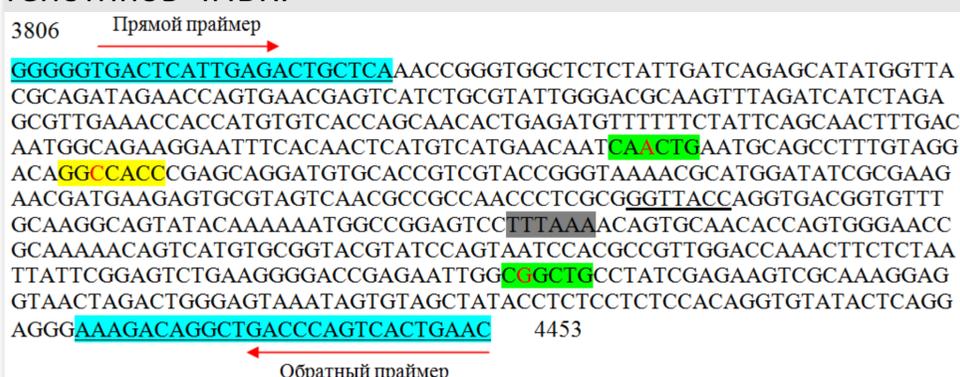


Рисунок 2. Расположение сайтов рестрикции в выбранном фрагменте ЧИКВ (сконструированный участок генома всех штаммов)

Таблица. Расчетная длина фрагментов рестрикции при типировании вируса Чикунгунья методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Генотип ЧИКВ Genotype CHIKV	Количество/ожидаемая длина фрагментов (п.н.) Number/estimated fragment's length (b.p.)		
	PspEI	PvuII	DraI
WAF	Один/648 One/648	Три/301;226;121 Three/301;226;121	Один/648 One/648
Asian	Два/350;298 Two/350;298	Один/648 One/648	Два/403;245 Two/403;245
ECSA	Два/350;298 Two/350;298	Два/527;121* Two/527;121*	Один/648 One/648
ECSA-IOL	Три /298;252;98 Three/ 298;252;98	Два/527;121 Two/527;121	Один/648 One/648

При проведении гидролиза фрагмента 648 п.н. с использованием эндонуклеаз рестрикции PspEI и PvuII в зависимости от генотипа ЧИКВ были получены длины, соответствующие расчетным (рис. 2).

Для дифференциации генотипов Asian и ECSA при проведении гидролиза фрагмента гена nsP2 была использована эндонуклеаза DraI. При проведении реакции были получены фрагменты длиной, соответствующей расчетной (рис. 3).

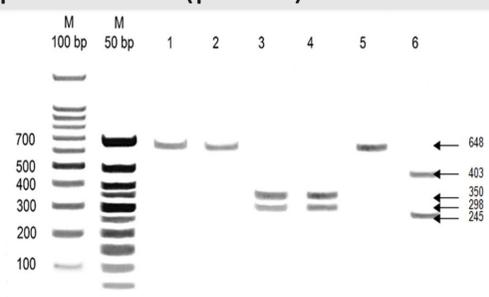


Рисунок 3. Результаты электрофоретической детекции гидролиза ПЦР-фрагментов штаммов ЧИКВ разных генотипов при использовании рестриктаз PspEI и PvuII. 1, 2 – маркеры молекулярного веса; 3 – амплифицированный фрагмент генома ЧИКВ (расчетная длина 648 п.н.); 4–7 – фрагменты после рестрикции PspEI энзимом: Asian (4), ECSA (5), ECSA-IOL (6), WAF (7); 8-11 - фрагменты после рестрикции PvuII энзимом: Asian (8), ECSA (9), ECSA-IOL (10), WAF (11).

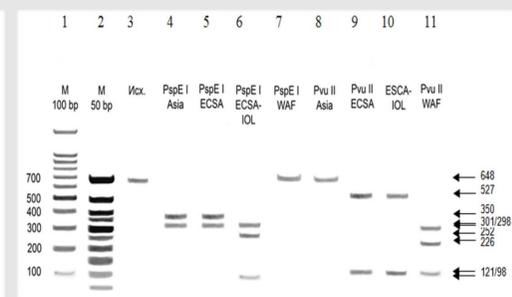


Рисунок 4. Результаты электрофоретической детекции гидролиза ДНК-фрагмента штаммов ЧИКВ генотипов Asian и ECSA рестриктазами PspEI и DraI. 1, 2 – амплифицированный фрагмент (расчетная длина 648 п.о.) генотипа Asian (1), генотипа ECSA (2); 3, 4 – ДНК-фрагменты после рестрикции энзимом PspEI генотипа Asian (3), генотипа ECSA (4); 5, 6 - ДНК-фрагменты после рестрикции энзимом DraI генотипа ECSA (5), генотипа Asian (6).

**Выводы.** Для быстрого подтверждения подлинности ЧИКВ и его генотипирования может быть успешно использован метод ПДРФ, который позволяет провести анализ в течение нескольких часов и в отсутствие высокотехнологичного оборудования.