

ГЕНОМИКА.  
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 578.53

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ  
И ТИМИДИНКИНАЗЫ ПОПУЛЯЦИИ ВИРУСА ГЕРПЕСА ПРОСТОГО  
ПЕРВОГО ТИПА МЕТОДОМ МАССИВНОГО  
ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

© 2013 г. А. А. Гуськова<sup>1\*</sup>, М. Ю. Скоблов<sup>1,2</sup>, А. В. Лавров<sup>1</sup>, Д. А. Зубцов<sup>3</sup>, В. Л. Андронова<sup>4</sup>,  
Д. В. Гольдштейн<sup>1</sup>, Г. А. Галегов<sup>4</sup>, Ю. С. Скоблов<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук, Москва, 115478

<sup>2</sup>Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва, 127473

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская обл., 141700

<sup>4</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Российской академии медицинских наук, Москва, 123098

<sup>5</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,  
Москва, 117997

Поступила в редакцию 20.11.2012 г.

Принята к печати 08.02.2013 г.

В лизате клеток Vero, инфицированных штаммом L2 вируса простого герпеса типа I, с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени определили соотношение ДНК вируса/ДНК клеток. После 24-часовой инкубации с момента инфицирования копияемость вируса достигает максимального значения. Выделенный суммарный препарат ДНК секвенировали с помощью технологии массивного параллельного секвенирования на приборе Ion Torrent. Определены нуклеотидные последовательности генов тимидинкиназы (UL23) и ДНК-полимеразы (UL30) популяции HSV-1 штамма L2, первичную структуру этих генов сравнивали с соответствующими нуклеотидными последовательностями известных штаммов HSV-1 KOS и 17. Выявленные различия в структуре генов UL23 и UL30 HSV-1 штамма L2 и референсных штаммов KOS и 17 не важны, так как замены находятся в неконсервативных областях.

**Ключевые слова:** ДНК-полимераза, тимидинкиназа, вирус герпеса простого первого типа, полногеномное секвенирование.

MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF DNA POL AND TK OF HSV-1 POPULATION USING NGS TECHNOLOGY, by A. A. Gus'kova<sup>1\*</sup>, M. Yu. Skoblov<sup>1,2</sup>, A. V. Lavrov<sup>2</sup>, D. A. Zubtsov<sup>3</sup>, V. L. Andronova<sup>4</sup>, D. V. Goldshtein<sup>1</sup>, G. A. Galegov<sup>4</sup>, Yu. S. Skoblov<sup>5</sup> (<sup>1</sup>Research Center for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia, \*e-mail:gousskova@gmail.com; <sup>2</sup>Moscow State Medical and Dental University, Moscow, 127473 Russia; <sup>3</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, State University, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia; <sup>4</sup>Ivanovskii Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 123098 Russia.; <sup>5</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia). It was determined the ratio of viral DNA and DNA from Vero cells using the polymerase chain reaction in real time in Vero cell lysate, infected with L2 strain of the herpes simplex virus type 1. Copy number of the virus reached a maximum after 24 hours of incubation of infection. Total DNA was isolated and sequenced using NGS technology by Ion Torrent device. Nucleotide sequences of the thymidine kinase gene (UL23) and DNA polymerase (UL30) were determined for a population of HSV-1 strain L2. Comparison of the primary structure of these genes with the corresponding nucleotide sequences of known strains of HSV-1 KOS and 17 was conducted. Differences in the structure of genes UL23 and UL30 between strain L2 and reference strains KOS and 17 are not important, because changes are found in non-conservative regions.

**Keywords:** DNA polymerase, thymidine kinase, herpes simplex virus type 1, NGS technology.

DOI: 10.7868/S002689841304006X

Принятые сокращения: HSV-1 (Herpes Simplex Virus) – вирус простого герпеса типа I; ПЦР – полимеразная цепная реакция.  
\* Эл. почта: gousskova@gmail.com

Одним из самых распространенных патогенов человека является вирус простого герпеса первого типа (HSV-1). Попадая внутрь организма, вирус остается там пожизненно. Само заболевание у большинства инфицированных людей протекает в виде периодически возникающих везикулярных высыпаний на слизистых оболочках, которые быстро проходят. Однако при иммунодефицитном состоянии пациента, которое может быть вызвано ВИЧ-инфекцией или процедурами, необходимыми при пересадке органов, инфекция HSV-1 может приводить к летальному исходу. До сих пор не разработано лекарственных средств, которые полностью уничтожали бы HSV-1. За последние полвека предложено много антигерпетических средств различной природы, из них наибольшее распространение получили модифицированные нуклеозиды, в том числе – ациклические нуклеозидные аналоги (ацикловир, ганцикловир и другие) [1], некоторые из них вошли в широкую медицинскую практику для терапии герпетических инфекций.

Механизм действия таких нуклеозидных препаратов хорошо известен [2]. Вначале при помощи вирусного фермента – тимидинкиназы – нуклеозид фосфорилируется до нуклеозид-5'-монофосфата, затем происходят еще две последовательные стадии фосфорилирования с использованием ферментов клетки-хозяина, в результате чего образуется соответствующий трифосфатный производный нуклеозид [3, 4]. На следующем этапе этот модифицированный нуклеотид включается при помощи вирус-специфической ДНК-полимеразы во вновь синтезируемую цепь ДНК, что приводит к терминации биосинтеза вирусной ДНК [5].

К сожалению, длительное применение нуклеозидных антигерпетических препаратов приводит к появлению устойчивых к действию этих соединений штаммов HSV-1 [6, 7], что обусловлено одним из следующих факторов или их сочетанием. Это или полная потеря активности, изменение субстратной специфичности, понижение экспрессии вирусной тимидинкиназы (1), или понижение активности или изменение субстратной специфичности вирусной ДНК-полимеразы (2). Возникновение таких резистентных к антигерпетическим препаратам штаммов HSV-1 побуждает исследователей к поискам новых лекарственных препаратов. В вирусологической практике для тестирования новых противогерпетических соединений используют ацикловир-чувствительные референсные штаммы. В России таким эталонным штаммом является HSV-1 L2. Ранее мы установили первичную структуру генов тимидинкиназы (*UL23*) и ДНК-полимеразы (*UL30*) этого штамма [8, 9].

Основная цель данной работы – оценить, имеется ли полиморфизм в первичной структуре генов *UL23* и *UL30* HSV-1 (штамм L2) в разных его популяциях, используя технологию массивного

параллельного секвенирования, а также сравнить штамм L2 с другими референсными штаммами HSV-1.

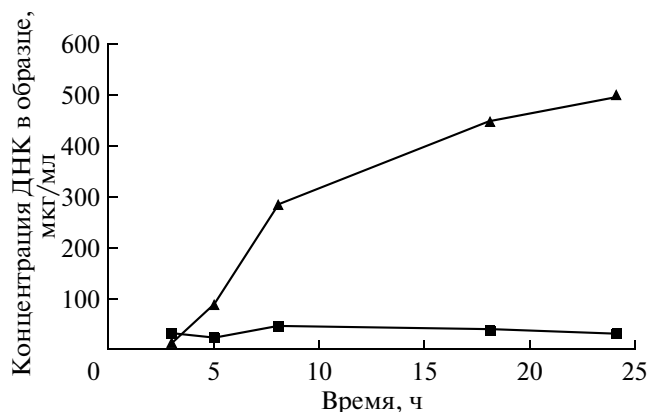
## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Наработка вируса.** Эталонный для России штамм HSV-1 L2 получен из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. Нарботка данного штамма производилась на клетках Vero (культура эпителиальных клеток почки африканской зеленой мартышки), как описано ранее [10]. Множественность инфицирования – 0.1 БОЕ/кл. Через 24 ч после инфицирования в подавляющем большинстве контрольных клеток (95–100%) развивался цитопатический эффект.

**Лизис клеток и выделение ДНК.** Инфицированные клетки Vero собирали, дважды промывали PBS (5 мМ фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0.14 М NaCl) и суспендировали в 1 мл того же буфера, разведенного в 10 раз. Суспензию дважды замораживали и оттаивали, затем добавляли 10%-ный раствор SDS до конечной концентрации 1% и протеиназу К до концентрации 50 ед./мл. Инкубировали 2 ч при 37°C. Аликвоту этого лизата использовали для определения соотношения ДНК вируса и ДНК клеток Vero с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени. ДНК из лизата клеток Vero выделяли, используя метод фенол-хлороформной экстракции с последующим переосаждением этиловым спиртом.

**Соотношение количества ДНК клетки хозяина и ДНК HSV-1 в лизате** определяли при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на приборе Step One Plus фирмы “Applied Biosystems” (США). В состав реакционной смеси входили: 10 мкл матрицы, 10 пикомоль праймеров (“ДНК-синтез”, Россия), 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ смесь dNTP, 0.5 ед. Taq-ДНК-полимеразы (“Диалат ЛТД”, Россия), однократный Taq-буфер, интеркалирующий краситель EvaGreen (“Biotium” Inc., США). В качестве матрицы использовали ДНК, выделенную из SDS-лизата клеток Vero, инфицированных HSV-1 L2.

В качестве маркера ДНК клетки хозяина использовали ген гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы первого типа. Данный ген амплифицировали при помощи праймеров HPRT1-nf и HPRT1-ng, которые были сконструированы нами при помощи программы Oligo 4.0. Биоинформатический анализ показал, что ген высококонсервативен у приматов, поэтому упомянутые праймеры универсальны для амплификации как геномной ДНК человека, так и ДНК африканской зеленой мартышки. В качестве маркера ДНК HSV-1 мы использовали ген тимидинкиназы этого вируса. Для амплификации данного гена использовали прай-



**Рис. 1.** Изменение концентраций вирусной ДНК HSV-1 L2 (▲) и ДНК клеток Vero (■) в клеточных лизатах, полученных методом ПЦР в реальном времени, через различные промежутки времени с момента инфицирования клеток вирусом.

меры Seq1 и qTKr, которые также сконструированы нами при помощи программы Oligo 4.0.

Seq1 – 5'-CGGGTGCTGGGGGCTTCC-3'

qTKr – 5'-GGT CAT GCT GCC CAT AAG AT-3'.

HPRT1-nf – 5'-CTG TGG CCA TCT GCT TAG TA-3'

HPRT1-nr – 5'-TAG TGC TGT GGT TTA  
AGA GAA T-3'

Для ПЦР в реальном времени использовали следующие условия: 94°C – 15 с, 60°C – 5 с, 72°C – 15 с 40 циклов. Качество полученного продукта амплификации оценивали при помощи кривой плавления от 72 до 95°C с шагом в 1°C.

Количество геномной ДНК определяли при помощи ПЦР фрагмента гена *HPRT1*. Для построения стандартной прямой использовали образцы геномной ДНК человека с известной концентрацией.

ДНК HSV-1 определяли при помощи ПЦР фрагмента гена тимидинкиназы. Для построения калибровочной прямой использовали образцы с известной концентрацией, содержащие плазмиду pGEM3zf– с клонированным геном тимидинкиназы HSV-1. Данная конструкция получена нами ранее [10].

**Массивное параллельное секвенирование**–проводили на приборе Ion Torrent PGM (“Life Technologies”, США) согласно протоколам производителя. Для приготовления геномной библиотеки использовали набор Ion Fragment Library Kit, для эмульсионной амплификации геномной ДНК – Ion Xpress Template Kit, для постановки реакции секвенирования – Ion sequencing Kit. Секвенирование проводили на микрочипе Ion 314™ Chip Ki со средней длиной прочтения в 100 н.

**Биоинформатический анализ.** Первичный анализ данных и картирование последовательностей

проводили при помощи встроенного программного обеспечения прибора Torrent Suite версии 2.2. Гены и их мутации анализировали при помощи программы Integrative Genomics Viewer. Последовательности сравнивали, используя пакет программ BLAST.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Секвенирование генов *UL23* и *UL30* в популяции вируса HSV-1

На первом этапе охарактеризовали препарат ДНК, приготовленный для полногеномного секвенирования HSV-1. Соотношение количества ДНК вируса к ДНК клетки хозяина определяли при помощи метода ПЦР в реальном времени. В качестве маркера ДНК HSV-1 использовали ген тимидинкиназы вируса герпеса, клонированный в плазмидном векторе pGEM-T Easy, а в качестве маркера клеточной ДНК – ген гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы первого типа (*HPRT1*). Анализируя базу данных GenBank, мы обнаружили, что ген *HPRT1* представлен единственной копией в геноме человека, именно поэтому он был выбран нами в качестве маркера геномной ДНК. Количество вирусной и клеточной ДНК определяли методом ПЦР в реальном времени в лизатах, полученных через различные промежутки времени после заражения (рис. 1). Из графика видно, что концентрация вирусной ДНК в лизате клеток максимальна через 24 ч.

При выделении препаративного количества ДНК для последующего секвенирования 10 миллионов клеток Vero инокулировали вирусом HSV-1 и растили 24 ч. Из клеточной массы выделяли геномную ДНК и при помощи ПЦР в реальном времени получали ее характеристики. Расчеты показали, что на одну клетку, содержащую диплоидный геном зеленой марьгишки, приходится порядка  $5 \times 10^5$  молекул ДНК вируса HSV-1. Однако при определении вирусного титра количество вирусных частиц на клетку оказалось несколько меньшим – порядка  $10^4$ . Это различие можно объяснить тем, что вирусологические методы позволяют определить только вирулентные частицы. Известно также, что при размножении вирус производит гораздо большее число частиц, из которых только небольшая доля достигает вирулентности.

На следующем этапе определяли последовательность ДНК популяции эталонного для России штамма HSV-1 L2 с использованием технологии полногеномного секвенирования на приборе Ion Torrent. Всего получено 499.714 прочтений последовательностей образца ДНК, что составляет 54.5 млн.п.н. Из них 287.567 прочтений принадлежит последовательностям вирусной ДНК (27.7 млн.п.н.). Средняя длина одного прочтения при качестве секвенирования AQ20 составляет 90 н.

Полученную нами последовательность генома HSV-1 сравнивали с последовательностью из базы данных GenBank HSV-1 штамма 17, который также является диким типом (NC\_001806.1). Глубина покрытия генома HSV-1 при этом составляет 181, т.е. каждый нуклеотид последовательности вируса был прочитан в среднем 181 раз. Прочитано 98% генома, оставшиеся 2% представляют собой фланкирующие повторы, которые не могли быть правильно картированы программой Torrent Suite 2.2 при первичном анализе данных.

Число некартированных последовательностей на геном HSV1 составило 26.8 млн.п.н. Все они относятся к хозяйской ДНК клетки Vero. Таким образом, при изучении данного штамма каждое второе прочтение последовательности относится к вирусной ДНК, покрытие которой в среднем составляет около 181 раз. Из этого следует, что технологии параллельного секвенирования позволяют успешно определять последовательности в смешанных препаратах ДНК подобного типа.

#### *Анализ генов тимидинкиназы и ДНК-полимеразы*

Наибольший интерес для нас представляют нуклеотидные последовательности генов тимидинкиназы и ДНК-полимеразы эталонного для России штамма L2. Ранее нами определены последовательности данных генов у этого штамма методом секвенирования по Сенгеру при использовании как радиоактивного фосфора-32, так и флуоресцентной метки [8, 9]. Результаты сравнения последовательностей двух генов, полученные двумя разными методами, приведены в табл. 1 и 2.

В гене тимидинкиназы обнаружено две мутации в положениях 35 (Т→G) и в 562 (Т→C), причем только первая из них приводит к аминокислотной замене в положении 12 (V→A). Ранее нуклеотидная последовательность гена тимидинкиназы определялась нами по классической схеме: клонирование фрагмента ДНК HSV-1 в плазмидном векторе, селекция клонов и наработка плазмидной ДНК, а затем секвенирование клонированного локуса. Фактически, по этой схеме определяется структура не гена тимидинкиназы HSV-1, а фрагмента ДНК, клонированного в плазмидном векторе [10]. Определение повторяли неоднократно с помощью разных приборов и получали одинаковые результаты, поэтому, скорее всего, расхождения в структуре не связаны с приборной ошибкой. Геномное секвенирование обеспечивает более чем 180-кратное покрытие искомого гена, т.е. одновременное независимое 180-кратное секвенирование исходных молекул вирусной ДНК, содержащей всю популяцию HSV-1 L2. Поэтому мы полагаем, что расхождение в последовательностях, в данном случае, можно объяснить ошибками при ДНК-полимеразном копировании гена тимидинкиназы на стадии клонирования фрагмента. Впрочем, возможно, что ошибки, как таковой, нет, а возможно —

**Таблица 1.** Замены в гене тимидинкиназы HSV-1 L2

Нуклеотидные замены			Аминокислотные замены		
Позиция	L2 СпС	L2 МПС	позиция	L2 СпС	L2 МПС
35	T	G	12	V	A
562	T	C			

Примечание. СпС – секвенирование по Сенгеру; МПС – массивное параллельное секвенирование.

**Таблица 2.** Замены в гене ДНК-полимеразы HSV-1 L2

Нуклеотидные замены			Аминокислотные замены		
Позиция	L2 СпС	L2 МПС	позиция	L2 СпС	L2 МПС
136	G	A	46	D	N
675	C	C/T			
1036	G	A			
1038	A	G	346	A	T
1127	A	A/G	376	E	G
2597	C	T	866	S	F
2611	A	A/G	871	D	N
2634	C	T			
3254	G	A	1085	G	E

Примечание. СпС – секвенирование по Сенгеру; МПС – массивное параллельное секвенирование.

в силу случайного обстоятельства — произошло копирование и клонирование минорной полиморфной мутации, которая представлена в популяции на уровне менее 1%.

В какой-то мере это предположение подтверждается работой по изучению гена тимидинкиназы у штаммов HSV-1, полученных из эталонного штамма L2 путем многократного пассирования на среде, содержащей Н-фосфонат ацикловира. У всех исследованных штаммов с развившейся резистентностью к Н-фосфонату ацикловира в 12-ом положении обнаружена замена V→A, т.е. структура гена тимидинкиназы этих штаммов аналогична структуре гена тимидинкиназы, определенной в популяции HSV-1 L2 путем массивного параллельного секвенирования [11]. Интересно, что при биоинформатическом анализе полученной структуры не обнаружено вариаций в одиночных нуклеотидных заменах. Это свидетельствует, скорее всего, о слишком небольшом числе таких вариаций, которые просто отсекаются программным обеспечением прибора и не учитываются в конечной структуре гена тимидинкиназы.

Аналогичная ситуация возникла при сравнении нуклеотидной последовательности гена ДНК-полимеразы штамма L2, полученной ранее [8, 9] и нуклеотидной последовательности данного гена, полученной при помощи массивного параллельного секвенирования: замены определены также — как на нуклеотидном уровне, так и на аминокислотном (см. табл. 2).

Интересно отметить, что некоторые нуклеотидные замены в последовательности гена ДНК-полимеразы (положение 136, 1036, 1038, 2634, 3254) обнаружены ранее в штаммах, резистентных к ацикловиру и Н-фосфонату ацикловира, которые получены из штамма HSV-1 L2 [8, 11]. Одна замена на нуклеотидном уровне в положении 2597 (С → Т) ранее в данном штамме не была отмечена. Эта мутация приводит к замене остатка серина в положении 866 на остаток фенилаланина.

Отдельно стоит отметить, что некоторые нуклеотидные замены в гене ДНК-полимеразы характерны для гетерозиготного состояния. Так, замена С на Т в положении 675 обнаружена только в 31% случаев, замена А на Г в положении 1127 — в 19% случаев, а замена Г на А в положении 2611 — в 30%. Эти данные свидетельствуют о том, что в популяции вирусов имеется, как минимум, несколько мажорных штаммов. При биоинформационном анализе отмечено также множество нуклеотидных мутаций в гетерозиготном состоянии, чья частота не превышает 5%. Все это свидетельствует о широко известной высокой мутабельности вируса герпеса.

### **Сравнительный анализ последовательностей генов тимидинкиназы и ДНК-полимеразы с последовательностями из других референсных штаммов HSV-1**

Далее сравнивали последовательности генов тимидинкиназы и ДНК-полимеразы, полученные при помощи метода массивного параллельного секвенирования, и генов других референсных штаммов HSV-1. Для этой цели из базы данных GenBank выбраны нуклеотидные последовательности геномов двух референсных штаммов — KOS (JQ673480.1) [12] и 17 (JN555585.1) [13]. Как в случае гена тимидинкиназы, так и в случае гена ДНК-полимеразы нуклеотидные и аминокислотные замены одинаково характерны для указанных штаммов (табл. 3 и 4).

При сравнении последовательностей гена тимидинкиназы штаммов L2 и KOS обнаружено десять мутаций, а штаммов L2 и 17 — тринадцать. При этом замены в положениях 16, 24, 125, 627, 915, 1042 совпадают у двух штаммов — в 17 и KOS. Кроме того, имеются совпадения и на аминокислотном уровне. Так, в обоих штаммах найдены замены в позициях 6, 42 и 348. Сравнительный анализ данных штаммов KOS и 17, а также штамма L2 показал, что в случае штамма KOS аминокислотный продукт отличается по пяти позициям, из них две замены (в положениях 23 и 89) характерны для штамма KOS. По сравнению со штаммом 17, тимидинкиназа L2 также отличается по пяти аминокислотным остаткам и также из них только две замены (в положениях 36 и 265) характерны для штамма 17.

**Таблица 3.** Различия в структуре гена тимидинкиназы штаммов L2, KOS и 17

Нуклеотидные замены				Аминокислотные замены			
позиция	L2 МПС	KOS	17	позиция	L2 МПС	KOS	17
16	G	T	T	6	G	C	C
68	A	G	A	23	N	S	N
24	G	A	A				
102	G	G	A				
106	G	G	A	36	E	E	K
125	C	T	T	42	P	L	L
171	C	T	C				
271	C	C	T				
266	G	A	G	89	R	Q	R
627	A	G	G				
694	C	T	C				
717	C	C	T				
793	A	A	G	265	T	T	A
915	C	T	T				
933	C	C	T				
969	C	C	T				
1042	A	G	G	348	I	V	V

Примечание. МПС — массивное параллельное секвенирование.

**Таблица 4.** Различия в структуре гена ДНК-полимеразы штаммов L2, KOS и 17

Нуклеотидные замены				Аминокислотные замены			
позиция	L2 МПС	KOS	17	позиция	L2 МПС	KOS	17
97	G	G	A	33	G	G	S
101	C	G	G	34	P	R	R
450	T	C	C				
636	T	T	C				
675	T	C	C				
831	C	C	T				
988	C	C	G				
989	G	G	C	330	R	R	A
1127	G	A	A	376	D	E	E
1173	C	T	C				
1176	C	T	C				
1584	T	C	T				
1696	G	A	G	566	A	T	A
2074	C	C	A				
2611	A	G	G	871	N	D	D
2670	A	A	C				
2713	A	A	G	905	M	M	V
2758	T	C	C	920	S	P	P
2805	A	G	G				
2949	A	A	C				
2985	A	A	G				
3371	C	A	C	1124	P	H	P
3507	A	G	G				
3545	G	A	A	1182	R	K	K
3596	A	C	C	1199	Q	P	P
3622	G	G	A	1208	A	A	T

Примечание. МПС – массивное параллельное секвенирование.

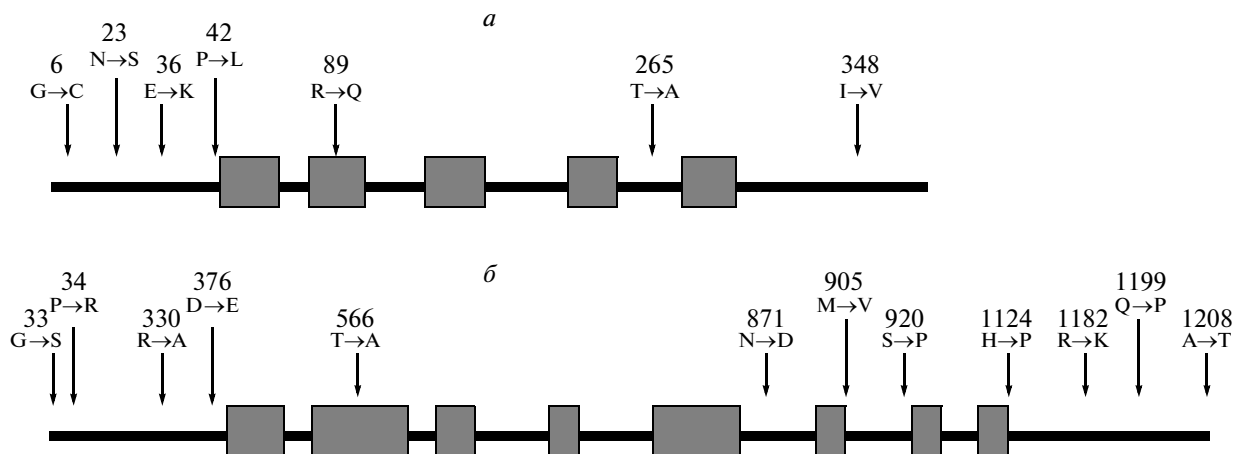
Как видно из рис. 2а, почти все мутации в гене тимидинкиназы не затрагивают консервативных областей данного гена, т.е., скорее всего, они не влияют на работу данного фермента.

При сравнении последовательности гена ДНК-полимеразы HSV-1 штамма L2 и штаммов 17 и KOS также обнаружены одинаковые для всех штаммов замены как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровнях. Имеются одинаковые мутации в позициях 101, 450, 675, 1127, 2611, 2758, 2805, 3507, 3545, 3596 (табл. 4), при этом общие аминокислотные замены найдены в позициях 34, 376, 871, 920, 1182. В случае ДНК-полимеразы штамм KOS отличается на две единичные аминокислотные замены (566 и 1124), тогда как штамм 17 – на четыре (в положениях 33, 330, 905, 1199, 1208). Таким образом, можно предположить, что эталонный штамм L2 более родственен штамму KOS, чем штамму 17. Следует также обратить внимание на то, что в гене ДНК-полимеразы популяции вируса HSV-1 штамма L2 не наблюдается гетерозиготности на аминокислотном уров-

не, что свидетельствует о большей консервативности данного гена по сравнению с геном тимидинкиназы.

Практически все обнаруженные аминокислотные замены не затрагивает консервативные области гена ДНК-полимеразы HSV-1 (рис. 1б) и, по-видимому, не существенны для функционирования данного фермента.

Таким образом, очевидно, что метод массивного параллельного секвенирования позволяет получать более детальную и объективную информацию о последовательностях ДНК, чем метод классического секвенирования по Сенгеру. Это особенно важно учитывать при анализе сложных объектов с высоким уровнем полиморфизма, например образцов опухолей, или, как в данном случае, образцов ДНК вирусных штаммов. При классическом секвенировании по Сенгеру определяют одну единственную последовательность, в которой могут оказаться ошибки, допущенные при клонировании. При массивном параллельном секвенировании большое (более 100 для



**Рис. 2.** Схематическое расположение аминокислотных замен относительно консервативных областей гена тимидинкиназы (а) и гена ДНК-полимеразы (б). Консервативные области в генах выделены прямоугольниками серого цвета.

оценки полиморфизма популяции клеток/вирусов) число раундов прочтений каждого нуклеотида с отдельной матрицы обеспечивает высокую степень надежности результатов и позволяет выявлять полиморфные состояния.

Анализ содержания вирусной ДНК в лизатах инфицированных клеток Vero показал, что при множественности инфицирования 0.1 БОЕ/клетку уже через 18 ч количество вирусной ДНК достигает значения, близкого к максимальному.

Массивное параллельное секвенирование HSV-1 может быть успешно использовано для структурного анализа генов в вирусологических исследованиях, причем, важно подчеркнуть, что для этого анализа не требуется специальной очистки вируса от ДНК клеток хозяина.

Обнаруженные различия в структуре генов UL23 и UL30 HSV-1 из штамма L2 и референсных штаммов KOS и 17 не существенны, так как замены расположены не в консервативных областях.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-00384).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Clercq E. 1993. Antivirals for the treatment of Herpesvirus infections. *J. Antimicrobial. Chemotherapy*, Suppl. A **32**, 121–132.
- Elion G.B. 1993. Acyclovir: discovery, mechanism of action and selectivity. *J. Med. Virol.* **S1**, 2–6.
- Miller W.H., Miller R.L. 1980. Phosphorylation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase. *J. Biol. Chem.* **255**, 7204–7207.
- Miller W.H., Miller R.L. 1982. Phosphorylation of acyclovir diphosphate by cellular enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 3879–3884.
- Spector T. 1989. Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. Mechanism of inhibition by acyclovir triphosphate. *J. Biol. Chem.* **264**, 7405–7411.
- De Clercq E., Naessens L., De Bolle L., Schols D., Zhang Y., Neyts J. 2001. Antiviral agents active against Human Herpesviruses. *Rev. Med. Virol.* **11**, 381–395.
- Blot N., Schneider P., Young P., Janvresse C., Dehedin D., Tron P., Vannier J.P. 2000. Treatment of an acyclovir and foscarnet-resistant herpes simplex virus infection with cidofovir in a child after an unrelated bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.* **26**, 903–905.
- Коровина А.Н., Гуськова А.А., Скоблов М.Ю., Андропова В.Л., Галегов Г.А., Кочетков С.Н., Куханова М.К., Скоблов Ю.С. 2010. Анализ мутаций в генах ДНК-полимераз и тимидинкиназ клинических изолятов вируса простого герпеса, резистентных к антигерпетическим препаратам. *Молекуляр. биология.* **44**, 488–496.
- Степаненко В.Н., Есипов Р.С., Мирошников А.И., Андропова В.Л., Галегов Г.А., Ясько М.В., Гуськова А.А., Скоблов А.Ю., Скоблов Ю.С. 2011. Клонирование, экспрессия, выделение и свойства тимидинкиназы вируса герпеса простого, штамм L2. *Биоорг. химия.* **37**, 1–6.
- Гуськова А.А., Загурный А.В., Скоблов М.Ю., Баранова А.В., Андропова В.Л., Янковский Н.К., Галегов Г.А., Скоблов Ю.С. 2005. Молекулярно-генетический анализ вируса герпеса простого типа 1. *Молекуляр. биология.* **39**, 155–158.
- Gus'kova A.A., Skoblov M.Y., Korovina A.N., Yas'ko M.V., Karpenko I.L., Kukhanova M.K., Andronova V.L., Galegov G.A., Skoblov Y.S. 2009. Antiherpetic properties of acyclovir 5'-hydrogenphosphonate and the mutation analysis of herpes virus resistant strains. *Chem. Biol. Drug Des.* **74**, 382–389.
- Macdonald S.J., Mostafa H.H., Morrison L.A., Davido D.J. 2012. Genome sequence of Herpes simplex Virus 1 strain KOS. *J. Virol.* **86**, 6371–6372.
- McGeoch D.J., Dalrymple M.A., Davison A.J., Dolan A., Frame M.C., McNab D., Perry L.J., Scott J.E., Taylor P. 1988. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* **69**, 1531–1574.