

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ПРОВЕДЕННЯ ІЗОТЕРМІЧНОЇ АМПЛІФІКАЦІЇ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ ВІРУСУ ПТАШИНОГО ГРИПУ H5N1

*В. О. Постоєнко¹, Б. В. Сорочинський², М. А. Сапачова¹, М. С. Карпуленко¹,
В. В. Кацімон¹, А. П. Герілович³*

¹Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

²Black & Veatch, Office in Kyiv, Ukraine

³ННЦ«Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

Синтезовано праймери для проведення ізотермічної ампліфікації κДНК вірусу пташиного грипу H5N1. Розроблено склад реакційної суміші та встановлено оптимальну температуру проведення ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот. Оптимальною температурою є 59 °С. Запропонований склад реакційної суміші та умови проведення реакції будуть в подальшому використані для розробки експрес-методу діагностики пташиного грипу.

В Україні протягом 2006–2008 рр. спостерігались спалахи високо патогенного грипу птиці (ВГП) H5N1.

Ця проблема є досить актуальною, адже хвороба завдає значних економічних збитків. Штами вірусу ВГП були спочатку виділені у курей та індиків. Але вважається, що птиця будь якого виду сприятлива до цього вірусу [1–4].

Діагноз на ВГП ставлять комплексно з урахуванням епізоотологічних даних, клінічної картини, патолого-анатомічних змін, результатів вірусологічних, серологічних та молекулярно-генетичних досліджень; кінцевий — при виділенні вірусу грипу птиці та його ідентифікації [1, 6, 7]. ВГП необхідно диференціювати від пастерельозу птиці, хвороби Ньюкасла та респіраторних захворювань, ларинготрахеїту [1, 5].

Саме тому, до методу діагностики ВГП висувається ряд вимог за такими показниками: специфічності, чутливості та тривалості проведення аналізу.

В останній час широкого розповсюдження для діагностики вірусних захворювань набуває високочутливий метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Цей метод базується на ампліфікації специфічних ділянок геному певного типу збудника. Висока чутливість, специфічність та короткий час проведення аналізу роблять цей метод перспективним при діагностиці ВГП. Але, на жаль, проведення ПЛР аналізу вимагає використання коштовного обладнання та реактивів і тому не завжди є доступним для лабораторій, що мають ресурсні обмеження [8].

Тому важливим є розробка простих і чутливих експрес-методів діагностики пташиного грипу, адаптованих до місцевих умов. Одним із таких є новий метод, який заснований на ізотермічній ампліфікації нуклеїнових кислот (LAMP) [9–11].

Початковим етапом в розробці експрес-методу є підбір праймерів та оптимізація умов проведення реакції ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот. Тому метою даної роботи є підбір праймерів та оптимізація умов проведення досліджуваної реакції.

Матеріали і методи. Ключовим етапом при створенні експрес-методу діагностики вірусу пташиного грипу є підбір послідовностей праймерів. Цей етап базується на попередньому вивченні літературних джерел, даних Інтернету і подальшій розробці праймерів. У роботі використовували набір праймерів, що описані в статті Shivakoti et al. [10] та синтезовані на

наше замовлення Metabion (Германія), кДНК референс-штаму вірусу пташиного грипу H5N1 була надана ННЦ «ІЕКВМ», м. Харків, Bsm DNA полімераза (Fermentas, Литва). Реакцію проводили з використанням термостату при температурі 57–61°C протягом 25–70 хв. відповідно. Реакцію зупиняли нагрівом реакційної суміші до 80 °C протягом 5 хв. Для оптимізації складових компонентів реакційної суміші досліджували різні концентрації праймерів; різні фарбники (betain, SYBR GREEN), їх концентрації в діапазоні 12,5–25 $\mu\text{mol/L}$ та внесення (до реакційної суміші та після проведення реакції). Також реакцію проводили при наявності M-MuLV Rtasе (200 U) та відсутності цього ферменту.

В якості негативного контролю (НКЗ) апробовували різні варіанти: кДНК замінювали тотожною по об'єму аліквотою буферу; праймери замінювали тотожною по об'єму аліквотою буферу; кДНК замінювали на ДНК мікоплазми. Всі варіанти негативного контролю не флуоресціювали після проведення реакції та на електрофореграмі були відсутні амплікони. У всіх випадках кінцевий об'єм реакційної суміші складав 25 μL .

Детекцію продуктів реакції проводили візуально під УФ-світлом та за допомогою електрофорезу у 1,2 % агарозному гелі з використанням трис-боратного буфера при градієнті напруги 10 В/см. Результати оцінювали при перегляді гелю після електрофорезу на транслюмінаторі під УФ-світлом за наявністю (або відсутністю) ампліконів різного розміру.

Результати й обговорення. У результаті проведених досліджень нами визначено оптимальний склад реакційної суміші, який наведено в таблиці.

Таблиця

Оптимальний склад реакційної суміші для проведення RT-LAMP

Компоненти реакційної суміші		Об'єм
10x Termopol буфер		2,5 μL
Betain		1 mmol/L
MgSO ₄		5 mmol/L
Деоксинуклеотид трифосфата (dNTP)		1,4 mmol/L
SYBR GREEN		12,5 $\mu\text{mol/L}$
MnCL ₂		0,5 mmol/L
Nuclease-free water		Up to 25 μL
Bsm DNA полімерази		8 U
PRIMER	F3	0,1 $\mu\text{mol/L}$
	B3	0,1 $\mu\text{mol/L}$
	FIP	0,8 $\mu\text{mol/L}$
	BIP	0,8 $\mu\text{mol/L}$
	LF	0,4 $\mu\text{mol/L}$
	LB	0,4 $\mu\text{mol/L}$
DNA		2 μL

Новизна розробленої нами реакційної суміші для LAMP субтипу H5N1 ВГП є використання ферменту Bsm ДНК полімерази замість Bst ДНК полімерази, яка застосовувалася іншими авторами з аналогічною метою [9–11].

Умови ампліфікації підбирались експериментально, змінюючи температуру та час при проведенні реакції. Встановлено, що оптимальною температурою реакції ізотермічної ампліфікації кДНК вірусу пташиного грипу H5N1 є 59 °C. Застосування температур проведення LAMP нижче і вище 59 °C зменшує інтенсивність флуоресценції досліджуваних позитивних зразків. При температурах вище 59 °C з'являється неспецифічна флуоресценція у негативному контролі, що містить праймери. Використання наведених умов реакції і реакційної суміші дає

чіткі і відтворювані результати з виявлення вірусу пташиного грипу H5N1 (рис. 1).

Необхідно відмітити, що встановлений нами температурний оптимум для LAMP кДНК вірусу пташиного грипу H5N1 відрізняється від аналогічних показників, отриманих для інших субтипів грипу типу А. Іншими авторами показано, що температурний оптимум для LAMP субтипу H1N1 — 55 °С, для субтипів H5, H7 — 60 °С [6, 11].

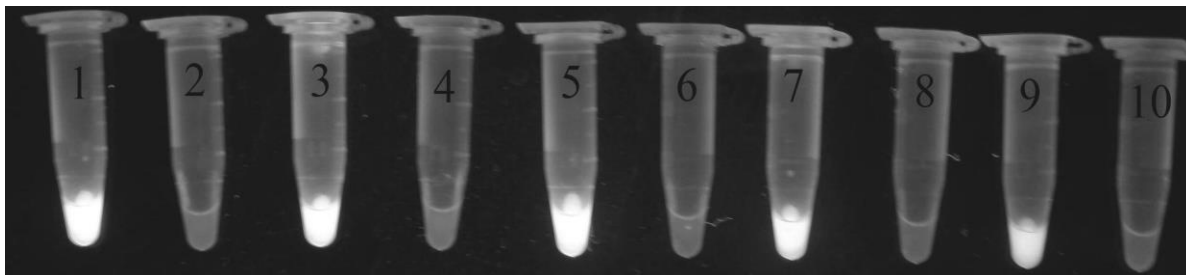


Рис. 1. Експериментальний підбір температурних режимів для LAMP по виявленню збудника пташиного грипу. **1** – кДНК ВГП, 57°С; **2** – НКЗ, 57°С; **3** – кДНК ВГП, 58°С; **4** – НКЗ, 58°С; **5** – кДНК ВГП, 59°С; **6** – НКЗ, 59°С; **7** – кДНК ВГП, 60°С; **8** – НКЗ, 60°С; **9** – кДНК ВГП, 61°С; **10** – НКЗ, 61°С.

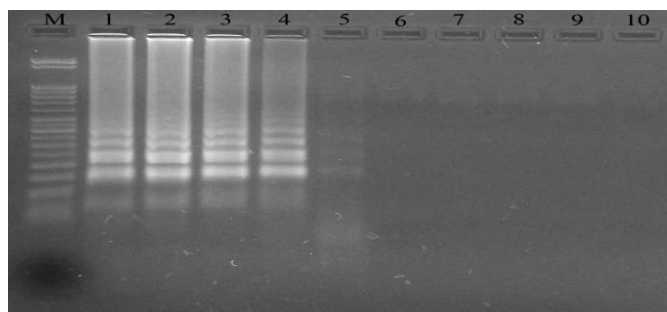


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації з різними температурними режимами для LAMP по виявленню збудника пташиного грипу. **М** – маркер молекулярної ваги (Step Ladder, 50 bp); **1** – кДНК ВГП, 57°С; **2** – кДНК ВГП, 58°С; **3** – кДНК ВГП, 59°С; **4** – кДНК ВГП, 60°С; **5** – кДНК ВГП, 61°С; **6** – НКЗ, 57°С; **7** – НКЗ, 58°С; **8** – НКЗ, 59°С; **9** – НКЗ, 60°С; **10** – НКЗ, 61°С.

Наявність продуктів ізотермічної ампліфікації кДНК вірусу пташиного грипу H5N1 в позитивних пробах та їх відсутність — в негативних також підтверджено нами методом електрофорезу (рис.2).

Встановлено, що найбільшу інтенсивність дають амплікони треку № 3, що відповідає температурі проведення LAMP 59 °С. При використанні температури 61° С (трек № 5) амплікони практично не утворюються після проведення LAMP.

Мінімальний та оптимальний час, необхідний для проведення реакції ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот детекції кДНК вірусу пташиного грипу H5N1 визначали зміною цього показника в діапазоні 25–70 хв. при температурі 59 °С (рис. 3).



Рис. 3. Часовий режим LAMP при 59 °С, з використанням кДНК вірусу H5N1. 1 – 25 хв; 2 – 30 хв; 3 – 40 хв; 4 – 50 хв; 5 – 60 хв; 6 – 70 хв; 7 – 60 хв, (НКЗ).

Встановлено, що за 50 хв. протікання LAMP відбувається утворення ампліконів (зразок № 4, рис. 3).

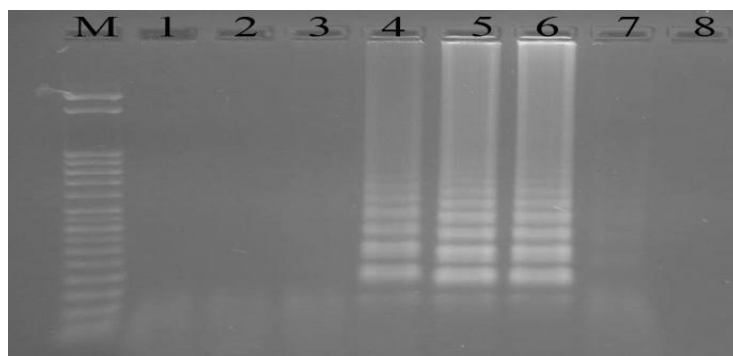


Рис. 4. Електрофореграма ампліконів, отриманих при різних часових режимах LAMP при 59 °С, з використанням кДНК вірусу H5N1. 1 – 25 хв; 2 – 30 хв; 3 – 40 хв; 4 – 50 хв; 5 – 60 хв; 6 – 70 хв; 7 – 60 хв (НКЗ).

Методом електрофорезу (рис. 4) підтверджено, що 50 хв. є мінімальним часовим показником для проведення ізотермічної ампліфікації субтипу H5N1 ВГП (трек № 4). Разом з тим, найбільшу інтенсивність проявили амплікони треку № 5, що дозволяє встановити оптимальний час для LAMP, який складає 60 хв.

Таким чином, проведені дослідження дозволили підібрати праймери, розробити склад реакційної суміші, встановити оптимум температури часу та мінімальний час для проведення LAMP субтипу H5N1 вірусу пташиного грипу.

ВИСНОВКИ

1. Підбрано та синтезовано праймери для детекції субтипу H5N1 вірусу пташиного грипу методом ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот.
2. Розроблено склад реакційної суміші для LAMP.
3. Встановлено, що оптимальною температурою і часом для LAMP є 59 °С та 60 хвилин.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується провести визначення чутливості, специфічності та відтворюваності розробленого нами методу LAMP субтипу H5N1 ВГП з метою його реєстрації в Україні та впровадження в практику ветеринарної медицини.

OPTIMIZATION OF CONDUCT ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACIDS OF AVIAN INFLUENZA VIRUS H5N1

*V. O. Postoienko¹, B. V. Sorochinsky², M. A. Sapacheva¹, M. S. Karpulenko¹,
V. V. Katsimon¹, A. P. Gerilovich³*

¹State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms

²Black & Veatch, Office in Kyiv, Ukraine

³NSC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine»

S U M M A R Y

Synthesized primers for cDNA isothermal amplification avian influenza virus H5N1 designed by composition of the reaction mixture, and determined the optimal temperature of the isothermal amplification of nucleic acids. The optimum temperature of 59° C. Composition of the reaction mixture and the reaction conditions will be further used to improve rapid method for avian influenza H5N1.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ГРИППА H5N1

*V. A. Postoienko¹, B. V. Sorochinsky², M. A. Sapacheva¹, M. S. Karpulenko¹,
V. V. Katsimon¹, A. P. Gerilovich³*

¹Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов

²Black & Veatch, Office in Kyiv, Ukraine

³ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины»

А Н Н О Т А Ц И Я

Синтезированы праймеры для проведения изотермической амплификации кДНК вируса птичьего гриппа H5N1. Разработан состав реакционной смеси и определена оптимальная температура проведения изотермической амплификации нуклеиновых кислот. Оптимальная температура 59 °С. Состав реакционной смеси и условия проведения реакции будут в дальнейшем использованы для разработки экспресс-метода диагностики птичьего гриппа

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине. Справочное пособие / А. Н. Головкин, В. А. Ушкалов, В. Г. Скрыпник и др. / Под ред. А. Н. Головкин. — Х.: «НТМТ», 2007. — 512 с.
2. Особоопасные болезни животных. Справочное пособие / И. А. Бакулов, В. М. Котляров, А. С. Донченко и др. Покров–Новосибирск, 2002. — 184 с.
3. Практикум по ветеринарной вирусологии. / Р. В. Белоусова, Н. И. Троценко, Э. А. Преображенская — М.: Колос, 2006. — 248 с.
4. *Alexander D. J.* A review of avian influenza in different bird species // *Vet. Microbiol.* — 2000. — Vol. 74. — P. 3–13.

5. Avian Influenza in Italy 1997–2001 / I. Capua, S. Marangon, M. dalla Pozza [et al.] // Avian Dis. — 2003. — Vol. 47. — P. 839-843.
6. *Francesca Sidoti*, Development of a Real – Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. / Francesca Sidoti, Francesca Rizzo, Cristina Costa and all. // Mol. Biotechnol. — 2010. — Vol. 44:41–50, P. 41–50.
7. Highly pathogenic avian influenza // Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines / O. I. E. — 2009.
8. Manual of Standards for Diagnostics Tests and Vaccines / Office International des Epizootic (OIE), 2011 (Рекомендації щодо стандартних діагностичних тестів і вакцин / Міжнародне епізоотичне бюро (МЄБ), 2011).
9. *J. Ji*. Molecular detection of Muscovy duck parvovirus by loop — mediated isothermal amplification assay. / J. Ji, Q. M. Xie, C. Y. Chen and all. // Poultry Science. — 2010. — Vol. 89: 477, P. 477–483.
10. *Shivakoti S., Ito H., Murase*. Development of reverse transcription – loop – mediated isothermal amplification (RT – LAMP) assay for detection of avian influenza viruses in field specimens // J. Vet. Med. Sci. — 2010. — Vol. 72. — P. 519–523.
11. *Wai–Yip Lam*. Development and Comparison of Molecular Assays for the Rapid Detection of the Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 Virus. / Wai – Yip Lam, Ting – Fan Leung, Nelson Lee and all // Journal of Medical Virology. — 2010. — Vol. 82: 675. — P. 675–863.