

Максимович В.В. - доктор ветеринарных наук, профессор*

Красочко П.П. – аспирант кафедры эпизоотологии*

Квач С.В. - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник**

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,

**ГНУ "Институт микробиологии НАН Беларуси"

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ REAL-TIME ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Приведены результаты разработки компонентов для полимеразной цепной реакции при диагностике инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Показана эффективность количественной real-time пцр для идентификации вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

The results of development of components for diagnostics of info are represented. The effectiveness of quantitative real-time of PCR for identification of virus of infections rhinotracheitis of cattle.

ВВЕДЕНИЕ

В этиологической структуре вирусных инфекций крупного рогатого скота инфекционный ринотрахеит занимает одно из ведущих мест и наносит значительный экономический ущерб. В связи с этим, данному заболеванию необходимо уделять особое внимание. Эта инфекция проявляется как остро протекающая контагиозная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся преимущественно катарально-некротическими поражениями дыхательного тракта, лихорадкой, общим угнетением и конъюнктивитом, а также развитием пустулезного вульвовагинита, при попадании вируса в половые органы животного и абортами. Заболевание вызывается ДНК-геномным вирусом Bovine herpesvirus 1 (BHV-1), относящемуся к семейству Herpesviridae, подсемейству Alphaherpesvirinae, роду Varicellovirus. Особенностью данного вируса является его длительная персистенция в организме после переболевания и выделение с различными секретами (носовыми истечениями, слезами, спермой, молоком и т.д.). Такие животные являются потенциальным источником распространения заболевания. Выявить их достаточно сложно, так как применяемые серологические методы не обнаруживают специфических антител, а вирусовыделение длительный (около 30 дней) и трудоемкий процесс. В данном случае целесообразно применять молекулярно-генетические методы, позволяющие определять непосредственно наличие возбудителя в организме исследуемого животного, а не результат жизнедеятельности возбудителя (взаимодействия организма животного и возбудителя заболевания). Одним из таких методов является полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Принцип ПЦР основан на многократном увеличении копий определенной последовательности ДНК, которая специфична только для данного возбудителя, используя праймеры (специфические олигонуклеотидные затравки, которые соответствуют началу и концу искомой специфической последовательности), дезоксинуклеотидтрифосфаты и фермент Taq-полимераза.

Благодаря развитию молекулярной биологии и техники, различные модификации полимеразной цепной реакции получили широкое распространение. Однако в на-

стоящее время самым перспективной модификацией полимеразной цепной реакции является *real-time* ПЦР (ПЦР в режиме реального времени).

Несмотря на одинаковый принцип реакции, методика *real-time* ПЦР выгодно отличается от традиционной ПЦР. В основу метода также заложено многократное копирование мишени, однако в *real-time* ПЦР возможно отслеживать течение реакции в реальном времени, т.е. наблюдать изменения после каждого цикла, а не по окончании реакции, как в случае традиционной ПЦР. Это достигается введением в реакционную смесь флуоресцирующих агентов, интенсивность свечения которых пропорционально количеству образующейся ДНК в реакционной смеси. Разрешающая способность позволяет детектировать двукратное увеличение продукта, в то время как на геле даже 10-ти кратное увеличение продукта трудно различимо. Благодаря этому возможно определять первоначальное количество ДНК в реакционной смеси, что позволяет вести наряду с качественным анализом количественный.

Вся информация о ходе реакции передается с амплификатора на персональный или карманный компьютер. В связи с этим отпадает необходимость в пост-ПЦР процедурах (приготовление геля, внесение проб на гель, электрофорез, считывание информации визуально в ультрафиолетовом свете или используя гель-датеры), что значительно снижает контаминацию ПЦР лаборатории.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в условиях кафедры эпизоотологии УО ВГАВМ, лаборатории диагностики РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского».

В работе использовали вакцинные штаммы вируса ИРТ КРС КМИЭВ-6 (БелНИИЭВ) и ТК-А.

Подбор праймеров и зонда осуществлялся с помощью программы «AlleleID» v6.0 на основе полных и частичных нуклеотидных последовательностей различных штаммов и изолятов вируса ИРТ из международного банка нуклеотидных последовательностей (GenBank).

Синтез праймеров проводили фосфорамидитным методом на автоматическом синтезаторе олигонуклеотидов «BIOSET ASM 800» (Био-Рад).

Олигонуклеотид синтезируется в направлении от 3'- к 5'-концу. В ходе синтеза 3'-концевой олигонуклеотид ковалентно связан с твердофазным носителем - СРГ (controlled pore glass). Мономерами при синтезе служат фосфорамидиты нуклеозидов.

Синтез начинается с деблокирования нуклеозида, находящегося на 5'-конце синтезируемого олигонуклеотида, при этом с 5'-ОН группы удаляется диметокситригидрильная (DMTr) защитная группа. Следующая стадия - конденсация, при которой активированный фосфорамидит нуклеозида ковалентно присоединяется к свободной 5'-гидроксильной группе концевого детритилированного нуклеозида. Эффективность такого присоединения около 99%. Для того, чтобы не накапливалось ошибочных олигонуклеотидов за счет оставшегося 1% непрореагировавших 5'-концевых гидроксильных групп - их блокируют ("кэпируют") с помощью реакции ацетилирования. Минимальное количество молекул, которые оказались незаблокированными в процессе реакции "кэпирования" продолжают участвовать в синтезе, и в результате после последнего цикла синтеза образуются более короткие продукты (олигонуклеотиды с пропущенными основаниями). После реакции конденсации и "кэпирования" два концевых основания синтезируемого олигонуклеотида оказываются связанными нестабильной фосфитной триэфирной связью. Перевод ее в стабильную фосфотриэфирную связь осуществляется за счет реакции окисления, которая завершает цикл присоединения од-

ного основания. Далее вновь следует стадия детритилирования и цикл повторяется. После присоединения последнего основания олигонуклеотид снимается с твердой фазы и с него удаляются оставшиеся защиты, что приводит к получению целевого олигонуклеотида.

После окончания синтеза проводят очистку олигонуклеотида с использованием ПААГ (полиакриламидного геля)

Выход целевого продукта в процессе синтеза равен эффективности реакции конденсации в степени $(n-1)$, где n -длина олигонуклеотида. Эффективность конденсации в течение реакции находится на уровне 99 - 99,5%. Таким образом, выход, к примеру, олигонуклеотида длиной 25 нуклеотидов равен 80 - 90%.

Необходимость очистки синтезированного олигонуклеотида обусловлено тем, что в процессе синтеза из-за того, что не все молекулы "кэпируются", наряду с целевым олигонуклеотидом накапливаются более короткие продукты, содержащие делеции, а также после удаления защитных групп с олигонуклеотида, сами защитные группы остаются как примесь. При этом, в неочищенном конечном продукте обязательно присутствуют существенные количества неорганических солей. Очистка с помощью гель-фильтрации (так называемое обессоливание), или с помощью переосаждения - убирает примеси защитных групп и солей, но основная проблема, из-за которой необходимо очищать олигонуклеотиды - короткие олигонуклеотидные продукты с неправильной последовательностью - этими способами не решается. Поэтому ВСЕ олигонуклеотиды, синтезируемые в нашей компании очищаются с помощью полиакриламидного гель-электрофореза и/или ВЭЖХ.

Для контроля качества синтезируемых олигонуклеотидов существуют два критерия качества. Первый - химическая чистота продукта (примеси более коротких олигонуклеотидов не допускаются). Контроль за этим осуществляется с помощью ВЭЖХ и электрофореза в ПААГе. Второй - точность последовательности, которую можно контролировать с помощью MALDI-TOF масс-спектрального анализа (для олигонуклеотидов длиной менее 45 оснований). Быть абсолютно уверенным в качестве олигонуклеотидов особенно важно при проведении продолжительных и сложных работ, таких как сайт-специфический мутагенез, клонирование с введением сайтов рестрикции и других.

Выделение ДНК осуществляли методом фенольной экстракции и с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN.

Постановку ПЦР проводили в real-time амплификаторе «Bio-Rad IQ5»(США) по двум методикам: с использованием красителя SYBR GREEN и с помощью зонда, сконструированного по технологии molecular beacon.

Реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, состав и температурный цикл которой был различный в зависимости от этапа проводимого исследования.

Положительный контроль для калибровочной кривой получали путем клонирования ампликона, полученного с помощью праймеров BF1 и BR1 с использованием в качестве матрицы ДНК штамм вируса КМИЭВ-6, в плазмиду pXCM1 (The cloning vector collection, Япония). Полученную плазмиду нарабатывали стандартными молекулярно-биологическими методами, определяли ее концентрацию спектрофотометрически и делали серию разведений 10^2 — 10^5 .

Температурные профили денатурации получали подвергая растворы зонда (0,3 μ M) и зонда с положительным контролем (0,3 μ M и 0,9 μ M соответственно) постепенному снижению температуры с 94°C по 30°C и снятием показаний уровня флуоресценции с шагом 1°C продолжительностью 1 мин и предварительным прогреванием при 94°C в течение 5 мин в приборе «Bio-Rad IQ5».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка количественной ПЦР для определения вируса ИРТ была разделена на следующие этапы:

1. Анализ генома вируса и подбор праймеров.
2. Синтез праймеров и проверка их специфичности.
3. Оптимизация условий проведения ПЦР.
4. Получение положительного контроля и определение его концентрации.
5. Получение и тестирование зонда. Оптимизация его концентрации для ПЦР.
6. Тестирование разработанного метода на разведениях вируса и определение его чувствительности.

Для анализа генома вируса ИРТ были получены нуклеотидные последовательности штаммов Cooper, LD 15, LD 30/2, LD 50/2, BH53, BH81, A7, IBR6813, IBR2113 из международного банка нуклеотидных последовательностей (GenBank). С помощью программы «AlleleID» v6.0 были получены несколько пар праймеров. Путем анализа была выбрана пара gBR (TCCACTTCTCCACGATGC) и gBF (ACGACGGACGATGTGTAC) как наиболее специфичная для всех проанализированных штаммов.

При подборе праймеров анализировались нуклеотидные последовательности, полученные из международного банка нуклеотидных последовательностей (GenBank), следующих штаммов: Cooper, LD 15, LD 30/2, LD 50/2, BH53, BH81, A7, IBR6813, IBR2113. Используя программу «AlleleID» v6.0 получили несколько последовательностей пар праймеров, из которых пара gBR и gBF являлась наиболее специфичной для всех проанализированных штаммов.

Проверку специфичности праймеров проводили, используя в обычной ПЦР штаммы КМИЭВ-6 (РУП «ИЭВ им. С.Н.Вышелесского») и ТК-А. При проведении электрофореза наблюдались четкие полосы на геле на уровне 85 пар нуклеотидов.

На следующем этапе были проанализированы существующие методики количественной ПЦР. Выбор был сделан в пользу использования SYBR GREEN и технологии «молекулярных маячков» («molecular beacons»). Данные методики обладают всеми преимуществами ПЦР в режиме реального времени, однако, имеют существенные отличия. Так, SYBR GREEN – это интеркалирующий краситель, который при связывании с двухцепочечной ДНК значительно увеличивает уровень флуоресценции (примерно в 1000 раз) при сравнении со свободным состоянием. Его недостатком является неспецифичность. Краситель связывается с любой двухцепочечной ДНК, таким образом, невозможно определить образуется требуемый специфичный продукт или же это результат образования неспецифичных продуктов амплификации. В данном методе возможно использование анализа кривой плавления продуктов амплификации. Суть анализа заключается в том, что зная искомую последовательность нуклеотидов, возможно предсказать температуру плавления продуктов амплификации и проводя постепенное повышение температуры на графике в точке плавления продукта будет видно значительное падение уровня флуоресценции. Если температура плавления специфичного продукта совпадает с температурой пика падения уровня флуоресценции, то считается, что проба положительна. Однако, существует вероятность наличия неспецифичного продукта с такой же температурой плавления. Зонд, сконструированный по технологии molecular beacon, не имеет данного недостатка. Он представляет собой олигонуклеотид с комплементарными участками начала и конца и имеющимися на них флуоресцентной меткой и тушителем флуоресценции. Зонд имеет два энергетически выгодных состояния. В свободном состоянии начало и конец сомкнуты, флуоресцентная метка и тушитель флуоресценции находятся на близком расстоянии, соответственно флуоресценция отсутствует. При наличии комплементарного участка од-

ноцепочечной ДНК происходит связывание зонда, при этом он раскрывается, флуоресцентная метка и тушителъ расходятся на расстояние, и регистрируется увеличение флуоресценции. Благодаря связыванию зонда только с комплементарным участком ДНК данная методика является высокоспецифичной.

Для оптимизации условий ПЦР использовали SYBR GREEN. Первоначально определили оптимальную концентрацию праймеров для наибольшей чувствительности ПЦР. Для этого подготовили 4 разведения пар праймеров с концентрациями 10, 5, 2,5 и 1,25 пмоль/мл. Реакцию проводили в 20 мкл ПЦР смеси, содержащей по 1 мкл праймеров gBR и gBF, 10 мкл 2x премикса IQ SYBR Green (Bio-Rad, США), 3 мкл деионизированной воды и 5 мкл ДНК. Температурный режим реакции состоял из 5 мин первоначального прогревания при температуре 95°C, далее 40 циклов состоящих из 30 сек денатурации при 95°C, 15 сек отжига при 55°C, 30 сек элонгации при 72°C. Снятие показателей флуоресценции проводилось после стадии элонгации. Для подтверждения специфичности продуктов проводился анализ кривой плавления. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты ПЦР при оптимизации концентрации праймеров.

№ образца	Концентрация праймеров (пмоль/мл)	Значение порогового цикла (C _t)
1	10	36,57
2	5	33,82
3	2,5	35,77
4	1,25	-

Таким образом, наиболее эффективной концентрацией праймеров является 5 пмоль/мл.

Далее определили оптимальную температуру отжига праймеров. Для этого использовали те же условия, что и в предыдущем эксперименте с отличием в использовании праймеров с концентрацией 5 пмоль/мл и различной температурой отжига. Прибор «Bio-Rad IQ5»(США) позволяет в одном эксперименте использовать различную температуру в каждом горизонтальном ряду планшета. Был задан градиент температур от 50°C до 60°C. Наилучший результат амплификации был при температурах отжига от 52°C до 54°C, при этих значениях конечный уровень флуоресценции был выше(рис.1, табл.2). Таким образом, ранее теоретически определенная температура отжига 54°C является оптимальной.

Таблица 2 - Конечные значения флуоресценции амплификации при определении оптимальной температуре отжига праймеров.

№ образца	Значение температуры отжига, °С	Конечное значение флуоресценции, RFU
1	60	725
2	59.5	773
3	58,3	817
4	56.4	781
5	53.9	899
6	52.1	827
7	50.8	848
8	50	653

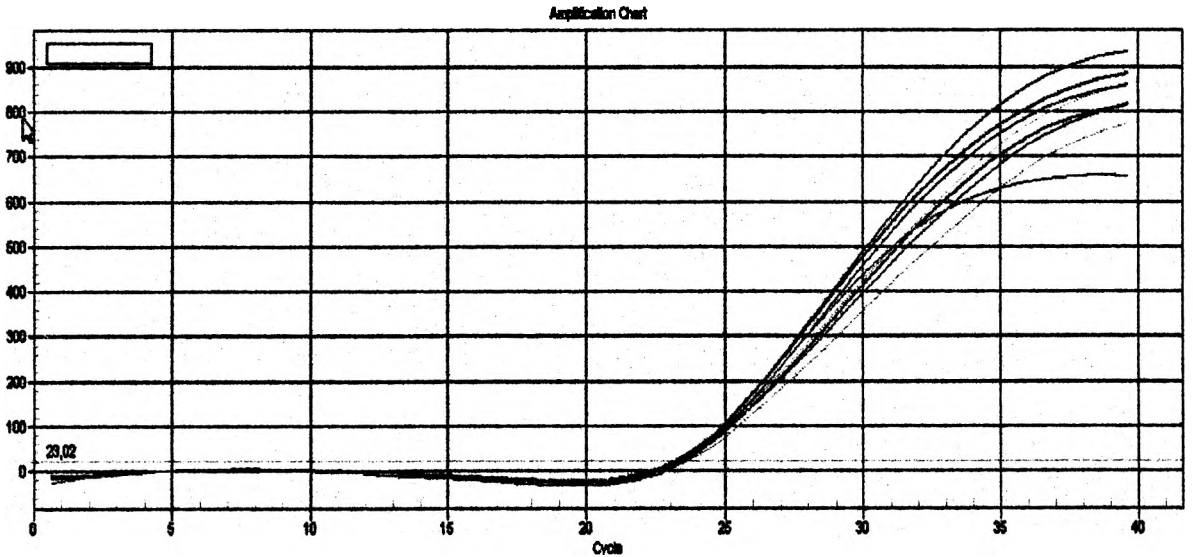


Рисунок 1 — График амплификации при определении оптимальной температуры отжига праймеров

На основе ДНК штамма КМИЭВ-6 вируса ИРТ получили положительный контроль и определили его концентрацию. После выделения, концентрация ДНК плазмиды длиной 2789 пар оснований составляла 0,385 мкг/мл. Путем расчетов определили, что эта концентрация соответствует 128×10^9 молекул/мл. На основании этих данных подготовили серию десятикратных разведений с концентрацией ДНК от 10^2 до 10^7 копий/мл.

После оптимизации условий проведения ПЦР, была проведена работа по созданию и оптимизации использования зонда. На основе ранее полученных праймеров и нуклеотидных последовательностей штаммов вируса ИРТ в программе «AlleleID» v6.0 был создан зонд MB FAM-CGCGATCCGGGGCTCTACCGCACGGGCGATCGCG-BHQ. Для определения оптимальной температуры гибридизации зонда и ДНК-мишени были проанализированы температурные профили денатурации. При низких температурах в растворе, содержащий зонд и комплементарную ДНК, регистрировался более высокий уровень флуоресценции. При повышении температуры происходила денатурация ДНК и зонда, что сопровождалось снижением уровня флуоресценции. В противоположность этому, в растворе, содержащем зонд MB, наблюдалось увеличение флуоресценции при температуре плавления комплементарных начала и конца, т.е. при 62°C. В температурном диапазоне 50-62°C в пробе, содержащий зонд и комплементарную ДНК, наблюдался значительно больший уровень флуоресценции, что позволяет детектировать продукты ПЦР. Таким образом, температура 54°C (оптимальная для отжига праймеров) также является оптимальной для детекции продуктов амплификации зондом MB.

Для возможности количественного определения ДНК возбудителя ИРТ необходимо иметь ряд разведений положительного контроля с заранее известной концентрацией, на основании которых строится калибровочная кривая и определяется концентрация вируса в неизвестных образцах. Ранее полученные разведения положительного контроля показали хорошие результаты с использованием красителя SYBR Green. Для определения возможности использования этих контролей с зондом MB была поставлена ПЦР со следующими условиями: 5 мин первоначального прогревания при температуре 95°C, далее 40 циклов состоящих из 30 сек денатурации при 95°C, 15 сек отжига при 54°C, 30 сек элонгации при 72°C. Использовали концентрации стандартов от 10^3 до 10^6 . Результаты на рис.2.

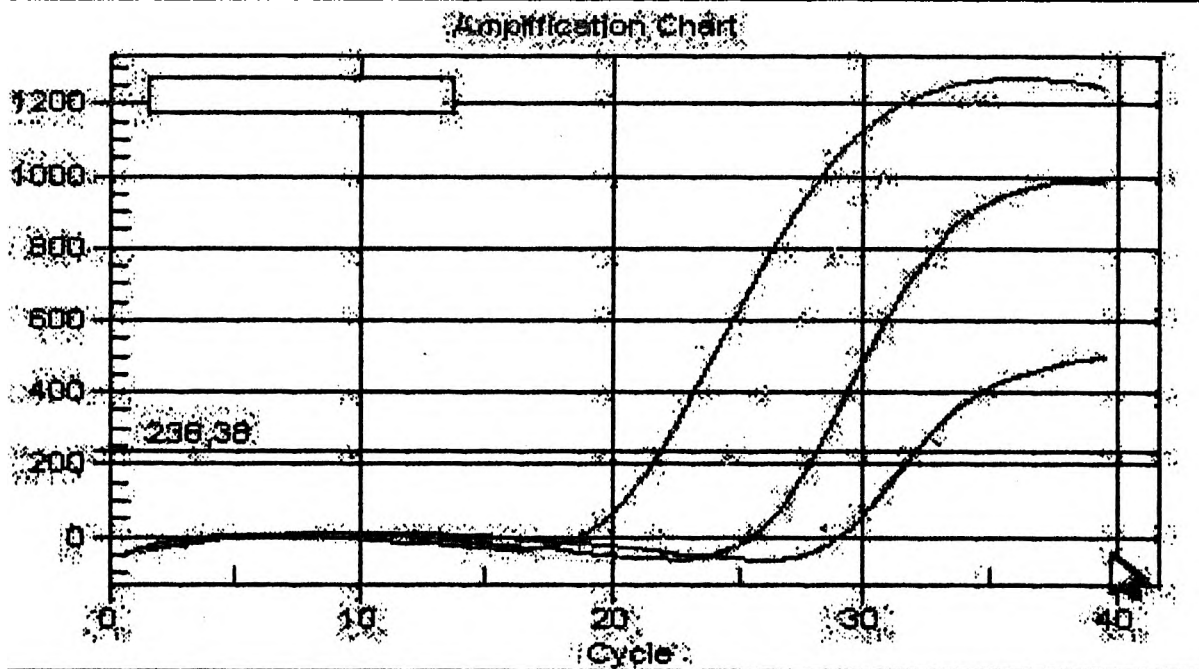


Рисунок 2 — График амплификации при использовании разведений положительного контроля

Тестирование разработанного метода проводили разведениях штамма КМИЭВ-6 вируса ИРТ. Для этого приготовили 10-ти кратные разведения вируса в первоначальной концентрации 7 Ig. Из полученных разведений методом фенольной экстракции была выделена ДНК. С полученными выделениями ДНК была поставлена ПЦР с условиями, аналогичными условиям при калибровке положительных контролей. Для количественного определения вируса в выделениях в реакции использовались 4 стандарта (положительных контроля) с концентрацией от 10^3 до 10^6 . Результаты представлены на рисунке 3 и в таблице 3.

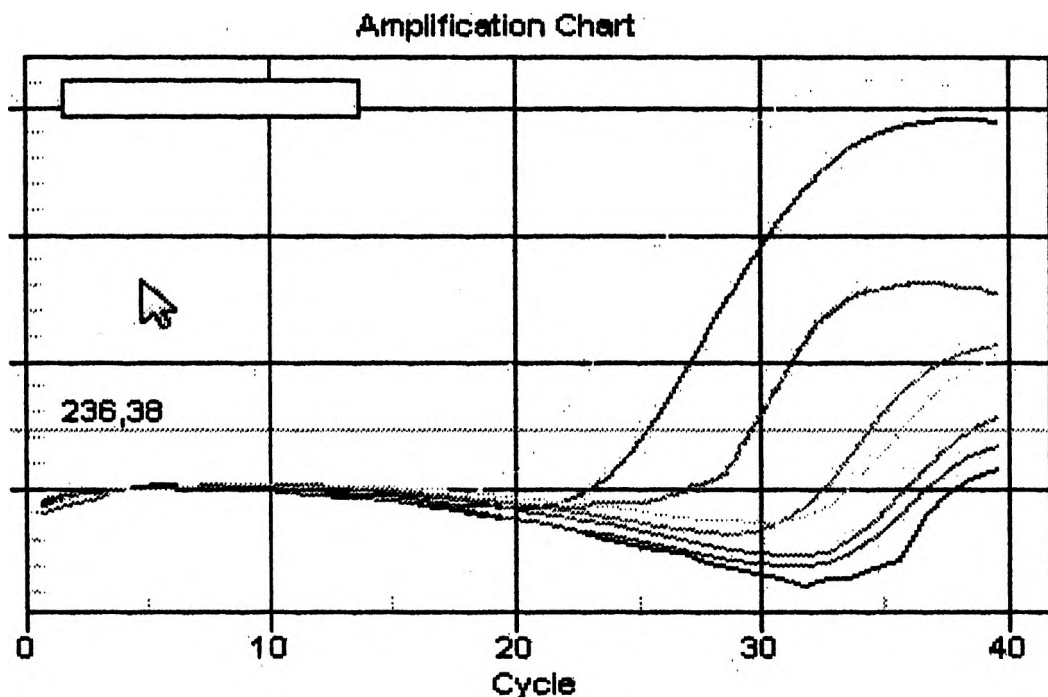


Рисунок 3 — График амплификации разведений вируса с концентрацией от 1 Ig до 7 Ig (амплификация положительных контролей не отражена)

Таблица 3 — Результаты амплификации разведений вируса.

№ п/п	Наименование образца	Пороговый цикл, (Ст)	Начальное количество, копий/образец
1	развед. вируса 7 Lg	21,52	1,102E+06
2	развед. вируса 6 Lg	25,39	7,737E+04
3	развед. вируса 5 Lg	29,93	2,807E+03
4	развед. вируса 4 Lg	34,48	1,489E+02
5	развед. вируса 3 Lg	38,58	8,826E+00
6	развед. вируса 2 Lg	39,78	2,226E+00
7	развед. вируса 1 Lg	-	0,000E+00
8	Положит. контроль	31,98	1,000E+03
9	Положит. контроль	28,07	1,000E+04
10	Положит. контроль	24,78	1,000E+05
11	Положит. контроль	21,92	1,000E+06

Из таблицы видно, что чувствительность данного метода позволяет определить в образце наличие вируса с концентрацией 2 lg, что соответствует 2 копиям ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время интенсивное ведение животноводства требует более быстрых и совершенных методов не только диагностики заболеваний, но и контроля био-препаратов. Получившие в последнее время развитие и совершенствование методики полимеразной цепной реакции позволяют более быстро справляться с задачами постановки диагноза. Кроме того, точность и чувствительность ПЦР превосходят традиционные методы, снижается вероятность получения ложноотрицательных результатов.

Разработанная методика позволяет быстро определять не только наличие вируса ИРТ, но и его первоначальное количество в пробе. Благодаря использованию зонда МВ, построенного по технологии «molecular beacon», данный метод является высоко-специфичным. Это связано с тем, что флуоресценция регистрируется только, когда зонд связывается с комплементарным участком ДНК, в противном случае результат будет отрицательный. Чувствительность данной методики позволяет определить в образце наличие вируса с концентрацией 2 lg, что соответствует 2 копиям ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глотов А.Г. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, А.Ф. Шуляк, Т.И. Глотова и др. // РАСХН, Сиб. отд-ние, ГНУ ИЭВСиДВ. – Новосибирск, 2006. – 196 с.
2. Говорун В.М. Новые направления в ДНК-диагностике / В.М. Говорун // Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний: Материалы 2-й Всероссийской науч.-практ. конф. (Москва, 20-22 января 1998г.). – Москва, 1998. – С. 12-13.
3. Гусева Е.В. Применение ПЦР в диагностике инфекционных болезней сельскохозяйственных животных / Е.В. Гусева, Т.А. Сатина, Т.А. Фомина // Науч. основы технологии пром. производства вет. биол. препаратов. Тез. докл. 5-й Всероссийской конф. (Щелково, 14-17 мая). – Щелково, 1996. – С. 38 – 40.
4. Инфекционная патология животных: в 2 т/Под ред. А.Я.Самуйленко,

- Б.В.Соловьева, Е.А.Непоклонова, Е.С.Воронина – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т.1 – 2006.- 911 с.
5. Belak S. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology / S. Belak, A. Ballagi-Pordany // *Vet. Res. Commun.* - 1993.- Vol. 17. – P. 55-72.
 6. Bitsch V. Persistence of infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in Danish cattle herds / V. Bitsch // *Nord. Veter. Med.* – 1978. – Vol. 30, № 4 - 5. - P. 178 – 185.
 7. Chen W. Molecular Beacons: A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detecting Salmonella / W. Chen, G. Martinez, A. Mulchandani // *Analytical Biochemistry* - Vol.280, P. 166–172
 8. Engels M. Comparison of the genomes of infections bovine rhinotracheitis and infections pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis / M. Engels, F. Steck, R. Wyler // *Arch. Virol.* – 1981. – Vol. 67, №2. P. – 169 – 174.
 9. Gupta P.K. Cloning and expression of bovine herpesvirus – 1 glycoprotein C / P.K. Gupta, M. Saini, L.K. Gupta et al. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1999. – Vol.47 (№2). – P. 275-282.
 10. Roizman B. Family Herpesviridae. / B. Roizman, R.S. Desrosier, B. Fleckenstein / In: Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A. and Summers M.d. (Editors), *Virus Taxonomy*, 6th Rep. Of the Int. Committee on Taxonomy of viruses. *Arch. Virol.*, Suppl. 10, Springer-Verlag, Wien, New-York, 1995. - P. 114 - 127.
 11. Vet J. Design and Optimization of Molecular Beacon Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays / J. Vet, S. Marras // *Methods in Molecular Biology*, 2004. – Vol.288, P. 273-290.