



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 62794

(13) A

(51) 7 A61K39/21

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) ТЕСТ-СИСТЕМА "DIA-AMPLISENS SARS" ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ РНК КОРОНАВІРУСУ SARS МЕТОДОМ
ЗВОРотної ТРАНСКРИПЦІЇ ТА ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

1

2

(21) 2003054989

(22) 30 05 2003

(24) 15 12 2003

(46) 15 12 2003, Бюл. № 12, 2003 р.

(73) АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО ЗАКРИТОГО
ТИПУ НАУКОВО-ВИРОБНИЧА КОМПАНІЯ "ДІАП-
РОФ МЕД"

(57) Тест-система для виявлення РНК коронавірусу SARS методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції, що включає синтезування на основі олигонуклеотидних праймерів з

вірусної РНК-матриці вірусу SARS за допомогою зворотної транскриптази вірусспецифічної комплетарної ДНК, фрагмент якої потім ампліфікують в полімеразній ланцюговій реакції, яка відрізняється тим, що використовують метод екстракції РНК коронавірусу SARS, праймери та фрагменти ДНК внутрішнього контрольного зразка (ВКЗ), які дозволяють отримувати SARS-специфічні амплікони та ВКЗ розміром 221 п.н. та 400 п.н. відповідно.

Винахід належить до генної інженерії, медицини та може бути використаний для проведення досліджень з метою виявлення РНК вірусу SARS (важкого гострого респіраторного синдрому), який призводить до атипової пневмонії.

Відомий тест для виявлення вірусу SARS розроблено компанією "Focus Technologies" (США) [1]. З вірусної РНК-матриці вірусу SARS за допомогою зворотної транскриптази (ЗТ) синтезується вірусспецифічна кДНК, яка потім ампліфікується (багаторазово копіюється) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). РНК виділяють з 100мкл проби за допомогою автоматизованої системи NucliSens (bioMérieux). Олигонуклеотидні праймери, використані для ампліфікації та секвенування, отримано з відкритої рамки читання 1b для висококонсервативного гена полімерази коронавірусу. В Україні тест-системи для виявлення коронавірусу SARS до теперішнього часу не існувало.

В основу винаходу покладено завдання створити тест-систему «DIA-AmpliSens SARS» на основі оригінальних олигонуклеотидних праймерів для виявлення РНК коронавірусу SARS методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції. Матеріалом для дослідження при обстеженні амбулаторних хворих служать біологічна рідина та виділення з носоглотки, мазки з ротової порожнини, проби фекалій людини.

Аналіз за допомогою ПЛР складається з чотирьох стадій: виділення РНК, отримання комплетарної ДНК (кДНК) на матриці РНК в ході реакції

зворотної транскрипції, ампліфікації ділянки ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР та обліку результатів ПЛР-аналізу.

Приклад 1. Проведення аналізу клінічних проб. Виділення та очистка РНК з клінічних проб та ДНК контрольних зразків.

В необхідну кількість пробірок додають по 5мкл внутрішнього контрольного зразку (ВКЗ) та 450мкл лізуючого розчину, а також по 100мкл досліджуваної проби. В пробірку негативного контролю (НК) вносять 100мкл негативного контрольного зразку (НКЗ). В пробірку позитивного контролю (ПК) вносять 90мкл НКЗ та 10мкл позитивного контрольного зразку (ПКЗ SARS). Потім в кожну пробірку додають по 25мкл сорбенту і ретельно перемішують. Після центрифугування при 10тис об/хв віддаляють Супернатант, відмивають осад розчином для промивки та етанолом, потім додають в пробірку ацетон, ретельно ресуспендують сорбент і центрифугують при 10тис об/хв. Супернатант повністю віддаляють. Сорбент підсушують при 60°C протягом 5-10хв. Додають в пробірку по 50мкл РНК-елюенту. Знов центрифугують при 12-13тис об/хв протягом 1хв. Супернатант містить чисті РНК коронавірусу та ДНК контрольних зразків.

Проведення реакції зворотної транскрипції. Готують мікропробірки з реакційною сумішшю RT-mix з РНК-елюентом та ревертазою і туди до-

(13) A
(11) 62794
(19) UA

дають по 10мкл РНК-проби. Обережно перемішують і ставлять в ампліфікатор (термостат) при 37°C на 30хв. Одержану в реакції ЗТ кДНК використовують для послідуочної постановки ПЛР.

Проведення полімеразної ланцюгової реакції

В пробірки з ПЛР-сумішшю-1 та воском для ампліфікації ДНК досліджуваних та контрольних зразків додають ПЛР-суміш-2 та масло для ПЛР. Під масло додають по 10мкл кДНК зразків, що були отримані в реакції ЗТ РНК та контролю (ПКЗ кДНК). Як негативний контроль замість ДНК-проби в підготовлену пробірку вносять 10мкл ДНК-буферу. Ампліфікацію проводять за програмою, яка додається до ампліфікатора.

Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР

Після закінчення ампліфікації пробірки зі зразками досліджують стандартним методом електрофорезу в агарозному гелі. Облік результатів ПЛР-аналізу проводять згідно з "Інструкцією по використанню тест-системи". Наявність або відсутність на електрофореграмі специфічних смуг ампліконів кДНК розміром 221п. н. свідчить про присутність вірусної РНК SARS в досліджуваних зразках.

Приклад 2. Визначення чутливості та специфічності пропонованої тест-системи

Специфічність тест-системи визначалась при тестуванні панелі різних штамів коронавірусів, ротавірусів людини та тварин, астровірусів, норо-

вірусів, аденовірусів людини, вірусів грипу типів А та В, що виділені від птахів та тварин, респіраторно-синцитіального вірусу типу А, вірусів парагрипу 1, 2, та 3 типів, ентеровірусів, які були представлені ФГУ ВДНІІ Контролю, Стандартизації та Сертифікації Ветеринарних Препаратів - Центру якості ветеринарних препаратів та кормів, а також ДІСК ім. Л.А.Тарасевича (Москва, РФ). Всього було проконтрольовано 59 штамів вірусів та клінічний матеріал від здорових людей - 52 зразка змивів з носоглотки та 30 зразків фекалій.

Специфічність пропонованої тест-системи становила 100%, а аналітична чутливість тест-системи - 10^3 геном-еквівалент/мл вірусу SARS.

Таким чином, пропонована тест-система забезпечує виявлення вірусу SARS. Тест-система надійна в роботі, проявляє високу чутливість та специфічність.

Використана література

1. M. K. Mosch. Focus Technologies Offers First Commercial Laboratory Test for Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS).

http://www.focus technologies.com/catalog_focus

2. W. J. Bellini. SARS-CoV Specific RT-PCR Primers. CDC. DVRD/NCID/CDC. 2003. P1-2.

3. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Laboratory Diagnostic Tests. 29.04.2003. <http://www.who.int/csr/sars/diagnostictests/en/>