



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **25808** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
С12N 7/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ДНК ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

1

2

(21) u200703312

(22) 27.03.2007

(24) 27.08.2007

(46) 27.08.2007, Бюл. № 13, 2007 р.

(72) Герілович Антон Павлович, Стегній Борис  
Тимофійович, Кучерявенко Роман Олексійович(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИ-  
ТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕ-  
РИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"

(57) Спосіб виявлення ДНК вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, що включає ампліфікацію ДНК вірусу IPT як ПЛР-мішені, який **відрізняється** тим, що використовують праймери IRTV\_F(E) (5'GCT TCG GTC GAC ACG GTC TT') і IRTV\_R(E) (5'CTT TGT CGC CCG TTG AGT CG 3') до гена gE та Taq-полімерази за температури відпалу 55 °C і синтезу фрагмента довжиною 265 п.н.

Корисна модель відноситься до ветеринарної вірусології, зокрема до розробки молекулярно-генетичних способів діагностики герпесвірусних інфекцій, а саме, інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби (ВРХ) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Інфекційний ринотрахеїт великої рогатої худоби - надзвичайно розповсюджене, контагіозне захворювання, що супроводжується ураженням респіраторних та статевих органів.

Для індикації вірусу та його антигену запропоновані численні тести, у т.ч. реакція нейтралізації у культурі тканин, реакція непрямой гемаглютинації, реакція імунофлуоресценції, тощо [Д.В. Осидзе. Довідник «Інфекційні хвороби тварин». - М.: «Агропромиздат». - 1987. - 288с.]. Суттєвим недоліком зазначених тестів є їх низька чутливість (РНГА) та велика трудомісткість (РН, РІФ).

Кодекс інфекційних хвороб тварин Міжнародного епізоотичного бюро серед перерахованих вище тестів пропонує використання ПЛР з метою виявлення генів вірусних глікопротеїдів [www.oie.int].

Відомий спосіб виявлення 483 п.н. (пар нуклеотидів) ділянки гену gB за допомогою ПЛР-аналізу [Van Engelenburg F.A.C., Maes R.K., Van Oirschot J.T. Rapid and sensitive detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen by a polymerase chain reaction based assay // J. Clin. Microbiol., - 1993. - №31. - 3129-3135.]. Цей спосіб ґрунтується на застосуванні системи праймерів IRTVgB\_F/R та Pfu-полімерази. Це рішення може бути прототипом. Недоліком прототипу є нижча чутливість та вища собівартість за спосіб, що пропонується.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виявлення ДНК вірусу інфекційного ринотрахеїту ВРХ, що включає ампліфікацію ДНК вірусу IPT, як ПЛР - мішені шляхом використання праймерів IRTV\_F(E) (5'GCT TCG GTC GAC ACG GTC TT') і IRTV\_R(E) (5'CTT TGT CGC CCG TTG AGT CG 3') до гену gE та Taq-полімерази, за температури віджигу 55°C і синтезу фрагменту довжиною 265п.н, щоб забезпечити ефективність способу.

Як матеріал для дослідження використовують кров, стабілізовану цитратом натрію або розчином глюкози, внутрішні органи та змиви слизових оболонок від інфікованих тварин, а також зразки сперми та культуральні розплідки вірусу.

Екстракція загальної ДНК проводиться за допомогою набору для екстракції загальної ДНК-Сорб-А або ДНК-Сорб-Б (Амплісенс, Москва, Росія), або аналогічного. Процедура складається із лізису клітин та їх детриту, сорбції ДНК на сорбенті, дво-триразового відмивання сорбованої ДНК та екстракції ДНК із сорбенту за допомогою ТЕ-буферу.

Готують загальну (для усієї кількості проб) суміш реагентів для ампліфікації з розрахунку (на 1 пробу):

13,0мкл деіонізованої води;  
2,0мкл 50мМ Mg<sup>++</sup>;  
5,0мкл реакційного буферу;  
2,5мкл суміші dNTP;  
по 1мкл праймерів;  
0,5мкл Taq-полімерази.

Після додавання Taq-полімерази, що проводиться в останню чергу, одержану суміш ретельно

(13) **U**(11) **25808**(19) **UA**

перемішують на вертексі. Після чого, суміш у дозі 40мкл вносять в усі пробірки підготовлені для ампліфікації. Потім додають в усі пробірки по 1 краплі (близько 25мкл) мінерального масла. Для проведення ампліфікації у відповідну пробірку з реакційною сумішшю під шар масла вносять 5мкл розчину сумарної ДНК проби. Для негативного контрольного зразку в пробірку вносять - 5мкл деіонізованої води, а в пробірку для позитивного контрольного зразку - 5мкл розчину ДНК з інактивованої формаліном культуральної розплідки вірусу ІРТ. Пробірки закривають й центрифугують протягом 3-5 секунд при 2000об/хв на мікроцентрифузі. Переносять пробірки в нагрітий до температури 95°C програмний термостат (ампліфікатор) і проводять ампліфікацію за наступною програмою (табл.):

Після закінчення реакції проводять аналіз продуктів ПЛР, шляхом поділу фрагментів ДНК в агарозному гелі. Потім проводять електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР.

Приготування робочого розчину буфера (ТБЕ) для електрофорезу.

В мірну колбу ємністю 1000,0см<sup>3</sup> вносять вміст пакета з буфером для електрофорезу, доводять до мітки дистильованою водою та ретельно перемішують до повного розчинення осаду.

Приготування агарозного гелю. У конічну колбу ємністю 250см<sup>3</sup> вносять вміст одного пакета з агарозою, додають 100,0см<sup>3</sup> робочого розчину буфера ТБЕ і ставлять колбу на водяну баню. Вміст колби доводять до кипіння, повністю розтоплюють, помішуючи скляною паличкою та охолоджують до температури 50-60°C. Отриманий розчин агарози повинен бути прозорим і не вмішувати окремих нерозчинених часток. Після чого у колбу з розчином агарози вносять 50,0мкл розчину бромідуетидія.

Підготовка електрофоретичної камери до заливання агарозного гелю. Встановлюють гребінку на платформу, розміщуючи її на відстані 3см одна від одної та заливають у неї охолоджену до температури 50°C агарозу. Після застигання агарози (приблизно через 25-30хв.) обережно витягають гребінку; платформу з агарозним гелем переносять до електрофоретичної камери.

В електрофоретичну камеру заливають необхідну кількість розчину буфера ТБЕ так, щоб він покривав агарозний гель шаром завтовшки 4-5мм. Для нанесення проби відбирають у кількості 10мкл продукту ампліфікації та вносять у відповідну лунку агарозного гелю, під шар буфера ТБЕ так, щоб вміст одного кармана агарозного гелю не перетікав у інший.

Електрофорез проводять у градієнті напруги 8В/см. Потім виймають платформу з агарозним гелем з електрофоретичної камери, дають рідині стекти з гелю та промивають агарозний гель дистильованою водою у кількості 200см<sup>3</sup> 2-3 рази. Агарозний гель вміщують на скло УФ-трансліумінатору. Фрагменти аналізованої ДНК виявляються у вигляді смужок жовтогарячого ко-

льору при проходженні УФ-випромінювання з довжиною хвилі 310нм.

У негативному контрольному зразку (К-) смужки відсутні. Поява смужки на рівні позитивного контролю свідчить про контамінацію (забруднення) компонентів набору.

У позитивних контрольних зразках (К+) одна смужка жовтогарячого кольору розміром 265 нуклеотидний залишок (н.з.).

Відсутність смужки жовтогарячого кольору на рівні позитивного контролю (К+) (265 н.з.) свідчить про відсутність вірусу ІРТ. Наявність смужки, що відповідає за електрофоретичною рухливістю позитивному контролю (265 п.н.), свідчить про присутність вірусу ІРТ. Результат аналізу не можна вважати достовірним, якщо на доріжці будь-якого негативного контролю виявляється специфічна смужка. Необхідно поставити не менше трьох негативних контролів на етапі виділення ДНК і стільки ж на етапі постановки ПЛР для виявлення джерела контамінації.

Ефективність способу розкривається в прикладах.

#### Приклад 1

Для оцінки чутливості та відтворюваності способу щодо індикації ДНК вірусу ІРТ по-перше, вивчали можливість виявлення різної кількості специфічної ДНК. Дослідження були проведені у порівняльному аспекті з використанням набору для реакції імунофлуоресценції для виявлення ДНК вірусу ІРТ. Досліджували негативні та позитивні за РІФ зразки сперми, а також культуральні розплідки вірусу з різним титром.

З'ясовано, що запропонований спосіб здатен виявляти навіть ДНК вірусу у всіх пасажах в культурі клітин, а також у розведенні до 1:100000 розплідки ІРТ з титром 8,9 Іг ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, що за чутливістю перевершує аналогову методику в два рази. Дослідження були проведені триразове, при повтореннях результати відтворені.

#### Приклад 2

Для визначення специфічності способу було використано 10 проб клінічного матеріалу від інфікованих тварин і 5 - від інтактних.

Для контролю специфічності способу використовували зразки ДНК герпесвірусів індичок, хвороби Марека та хвороби Ауескі.

Після ампліфікації встановлено наявність специфічних смуг різної інтенсивності у всіх 10 пробах клінічного матеріалу, а також в треку позитивного контрольного зразку ДНК вірусу ІРТ. З пробами ДНК клінічного матеріалу від здорової великої рогатої худоби після ампліфікації не утворювалось смуг ампліконів.

Проби сумарної ДНК гетерогенних контролів також не утворювали специфічних смуг після реакції за способом, що пропонується.

Розроблено спосіб виявлення ДНК вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби за допомогою ПЛР, який може успішно використовуватись у практиці лабораторних досліджень.

Таблиця

Спосіб виявлення днк вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95°C	2 хв	1
2	95°C	1 хв	40
	55°C	1 хв	
	72°C	1 хв	
3	72°C	2 хв	1