



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **25810** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C12N 7/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ РНК-ВІРУСУ НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ

1

2

(21) u200703315

(22) 27.03.2007

(24) 27.08.2007

(46) 27.08.2007, Бюл. № 13, 2007 р.

(72) Стегній Борис Тимофійович, Герілович Антон Павлович

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"

(57) Спосіб виявлення РНК-вірусу ньюкаслської хвороби, що включає екстракцію РНК, її зворотну транскрипцію та ампліфікацію кДНК-вірусу ньюкаслської хвороби в ділянці гена F, який **відрізняється** тим, що використовують праймери "NDVfusionFF" (5' AGG CCT CTT GCA GCT GCA G 3'), "NDVfusionRR" (5' GTT GCA ACC CCA AGA GCT ACA C 3') та "lasotafusionR" (5' GTT GCA ACC CCA AGA GCC ACA CC 3') за температури відпалу 60 та 62 °C і синтезу фрагмента довжиною 345 п.н.

Корисна модель відноситься до ветеринарної вірусології, зокрема до розробки молекулярно-генетичних способів діагностики параміксовірусних інфекцій птиці, а саме, ньюкаслської хвороби (НХ) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Ньюкаслська хвороба птиці являє собою широко розповсюджене, надзвичайно контагіозне гостре вірусне захворювання сільськогосподарської та дикої птиці, що супроводжується високою летальністю серед інфікованого поголів'я.

Для індикації вірусу та його антигену запропоновані численні тести, у т.ч. реакція гемаглютинації (РГА), реакція затримки гемаглютинації (РЗГА), нейтралізації (РН) на курячих ембріонах, реакція непрямой гемаглютинації тощо [В.Н. Сюрин. Діагностика вирусных болезней животных. - М.: «Агропромиздат». - 1991. - 564с.]. Суттєвим недоліком згаданих тестів є їх низька чутливість (РНГА) та велика трудомісткість (РН).

Кодекс з інфекційних хвороб тварин Міжнародного епізоотичного бюро серед перерахованих вище тестів пропонує використання ПЛР з метою виявлення гену фузійного протеїну (F) [www.oie.int].

Відомий спосіб виявлення 600-800п.н.(пар нуклеотидів) ділянки гену F за допомогою nested-ПЛР [Дрыгин В.В. и др., 1998]. Цей спосіб ґрунтується на екстракції РНК вірусу НХ, її зворотній транскрипції та застосуванні системи праймерів В1-2 та D1-2 у nested-ПЛР. Це рішення може бути прототипом. Недоліком прототипу є низька чутливість та вища собівартість за спосіб, що пропонується.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виявлення РНК вірусу ньюкаслської хвороби, що включає екстракцію РНК, її зворотню транскрипцію та ампліфікацію кДНК вірусу ньюкаслської хвороби в ділянці гену F шляхом використання праймерів NDVfusionFF (5' AGG CCT CTT GCA GCT GCA G 3'), NDVfusionRR (5' GTT GCA ACC CCA AGA GCT ACA C 3') та lasotafusionR (5' GTT GCA ACC CCA AGA GCC ACA CC 3') за температури віджигу 60 та 62°C і синтезу фрагменту довжиною 345п.н, щоб забезпечити ефективність способу.

Спосіб виконується наступним чином:

Пробопідготовка.

Як матеріал для дослідження використовують кров, стабілізовану цитратом натрію або розчином глюкози, внутрішні органи та зміви слизових оболонок від інфікованої птиці, а також ембріональні та культуральні розплідки вірусу.

Екстракція загальної РНК проводиться за допомогою набору для екстракції Рибосорб (Ампі-сенс, Москва, Росія), або аналогічного. Процедура складається із лізису клітин та їх детриту, сорбції РНК на сорбенті, дво-триразового відмивання сорбованої РНК та екстракції РНК із сорбенту за допомогою DEPS-води.

Зворотна транскрипція сумарної РНК проводиться за допомогою набору Реверта-Л (Ампі-сенс, Москва, Росія), або аналогічного. Продукт зворотної транскрипції - кДНК застосовують як досліджувану пробу в реакції ампліфікації.

Ампліфікація.

(13) U

(11) 25810

(19) UA

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

13,5мкл деіонізованої води;

1,5мкл 50мМ Mg^{++} ;

5,0мкл реакційного буферу;

2,5мкл суміші dNTP;

по 1мкл праймерів (NDVfusionFF + NDVfusionRR для індикації вірусу НХ та NDVfusionFF + lasotafusionR - у разі необхідності виявлення вакцинного штаму LaSota);

0,5мкл Taq-полімерази.

Після додавання Taq-полімерази, що проводиться в останню чергу, одержану суміш ретельно перемішують на вортексі. Після чого, суміш у дозі 25мкл 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 кДНК проби. Для негативного контрольного зразку в пробірку вносять - 5мкл деіонізованої води, а в пробірку для позитивного контрольного зразку - 5мкл розчину кДНК з інактивованої формаліном ембріональної розплідки вірусу НХ. 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 1000,0см³ 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 250см³ вносять вміст одного пакета з агарозою, додають 100,0см³ 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 уніший.

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 200см³ 2-3 рази. Агарозний гель вміщують на скло УФ-трансілюмінатору. Фрагменти аналізованої ДНК виявляються у вигляді смужок жовтогарячого кольору при проходженні УФ-випромінювання з довжиною хвилі 310нм.

Облік результатів.

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 345 нуклеотидний залишок (н.з.).

Відсутність смужки жовтогарячого кольору на рівні позитивного контролю (К+) (345н.з.) свідчить про відсутність вірусу НХ. Наявність смужки, що відповідає за електрофоретичною рухливістю позитивному контролю (345п.н.), свідчить про присутність вірусу НХ. 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 відтворності способу щодо індикації РНК вірусу ньюкаслської хвороби по-перше, вивчали можливість виявлення різної кількості специфічної РНК різних штамів вірусу та LaSota зокрема. З цією метою досліджували штами ЛГ85 (9 log₂ за РГА), LaSota (8 log₂ за РГА) в різних розведеннях та польовий ізолят, виділений від крячка (8 log₂ за РГА).

Запропонований спосіб дозволив виявити РНК вірусу ньюкаслської хвороби штамів ЛГ85 та LaSota з титром до 0,5 log₂ за РГА, а польовий ізолят - в розведенні що мало активності 2 log₂ за РГА. Специфічна пара праймерів для ідентифікації штаму LaSota гібридизувалася лише з РНК цього штаму при 62°C. Дослідження були проведені дворазове, при повтореннях результати відтворені.

Приклад 2. Для визначення специфічності способу було використано 10 позитивних та 5 негативних проб. Для контролю специфічності використовували зразки РНК вірусів грипу птиці різних субтипів та штам УМ-93 вірусу хвороби Гамборо.

Після ампліфікації встановлено наявність специфічних смуг різної інтенсивності у всіх 10 позитивних пробах, а також в треку позитивного контрольного зразку РНК вірусу НХ. З пробами РНК з матеріалу від інтактних курячих ембріонів після ампліфікації специфічні продукти реакції не утворювались.

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

Розроблено спосіб виявлення РНК вірусу ньюкаслської хвороби за допомогою ПЛР, який може

успішно використовуватись у практиці лабораторних досліджень.

Таблиця

Спосіб виявлення РНК
вірусу ньюкаслської хвороби

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95°C	2хв	1
2	95°C	1хв	40
	60/62°C	1хв	
	72°C	1хв	
3	72°C	2хв	1