



УКРАЇНА

(19) UA (11) 29317 (13) U
(51) МПК (2006)
C12N 7/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ДНК ВІРУСУ ХВОРОБИ АУЄСКИ

1

2

(21) u200710068

(22) 10.09.2007

(24) 10.01.2008

(72) GERILOVICH ANTON PAVLOVICH, UA,
KOROVIN IGOR VIKTOROVICH, UA, STEGNIY
BORIS TIMOFIYOVICH, UA(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", UA

(56)

(57) Спосіб виявлення ДНК вірусу хвороби Ауєски,
що включає ампліфікацію ДНК вірусу ХА як ПЛР-
мішені, який **відрізняється** тим, що
використовують праймери AuDV_gE_F (5' TCG
GCC CTC GCC TCC CTG A') і AuDV_gE_R (5' TGC
CCA TCT CCG GGG CCT C 3') до гена gE та Taq-
полімерази, за температури відпалу 58 °C і
синтезу фрагмента довжиною 235 п.н.

Корисна модель відноситься до ветеринарної вірусології, зокрема до розробки молекулярно-генетичних способів діагностики герпесвірусних інфекцій, а саме, хвороби Ауєски (ХА) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Хвороба Ауєски - надзвичайно розповсюджене, контагіозне захворювання, що супроводжується ураженням центральної нервової системи та респіраторних органів.

Для індикації вірусу та його антигену запропоновані такі тести, як реакція нейтралізації у культурі клітин та метод імуноферментного аналізу. [В.Т.Сакович, А.Е.Антоненко. Сравнительная оценка иммуноферментного анализа на твердой фазе и реакции нейтрализации для диагностики болезни Ауески. - Вет. наука пр-ву. Минск - 1989. Вып.27, с.53-58]. Суттєвим недоліком згаданих тестів є їх велика трудомісткість.

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 560п.н.(пар нуклеотидів) ділянки гену gI за допомогою ПЛР-аналізу [Attenuated pseudorabies virus which includes foreign DNA encoding an amino acid sequence. US patent 5068192, 2002]. Цей спосіб ґрунтується на застосуванні системи праймерів PRVgI_F/R, та включає ампліфікацію ДНК вірусу, IPT, ПЛР-мішені Це рішення може бути прототипом. Недоліком прототипу є нижча

чутливість та вища собівартість способу, що пропонується.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виявлення ДНК вірусу ХА, що включає ампліфікацію ДНК вірусу IPT, як ПЛР - мішені шляхом використання праймерів AuDV_gE_F (5' TCG GCC CTC GCC TCC CTG A') і AuDV_gE_R (5' TGC CCA TCT CCG GGG CCT C 3') до гену gE та Taq-полімерази, за температури віджигу 58°C і синтезу фрагменту довжиною 235п.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 змиви слизових оболонок від інфікованих тварин, а також 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 TE-буферу.

Ампліфікація.

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

деіонізованої води	
50мМ Mg ⁺⁺	
реакційного буферу	
суміші dNTP	

(13) U

(11) 29317

(19) UA

праймерів	виявляються у вигляді смужок жовтогогарячого кольору при проходженні УФ-випромінювання з довжиною хвилі 310нм.
Taq-полімерази	

Після додавання Taq-полімерази, що проводиться в останню чергу, одержану суміш ретельно перемішують на вортексі. 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 ХА. 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 палочкою 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 броміду етидія.

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 уінший.

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 жовтогогарячого 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 жовтогогарячого кольору розміром 235 нуклеотидний залишок (н.з.).

Відсутність смужки жовтогогарячого кольору на рівні позитивного контролю (К+) (235н.з.) свідчить про відсутність вірусу ХА. Наявність смужки, що відповідає за електрофоретичною рухливістю позитивному контролю (235п.н.), свідчить про присутність вірусу ХА. 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 ХА досліджували проби крові від свиней, що позитивно (15 голів) та негативно (15 голів) реагували на «Аулергін ІЕКВМ для прижиттєвого виявлення свиней-вірусоносіїв при хворобі Ауескі» ТУ У 46.15.271-97 запропонованим методом та в реакції нейтралізації.

Результати досліджень наведені в таблиці 2.

Дослідження були проведені триразово, при повтореннях результати відтворені.

Приклад 2. Для визначення специфічності способу було використано 10 проб клінічного матеріалу від інфікованих тварин і 5 - від інтактних. Інфіковані тварини були виявлені за допомогою діагностичного препарату.

Для контролю специфічності способу використовували зразки ДНК герпесвірусів індинок, хвороби Марека та інфекційного ринотрахеїту ВРХ.

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

Проби сумарної ДНК гетерогенних контролів також не утворювали специфічних смуг після реакції за способом, що пропонується. Розроблений спосіб виявлення ДНК вірусу хвороби Ауескі за допомогою ПЛР, може успішно використовуватись в умовах біотехнологічного виробництва вакцин.

5

29317

6

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95°C	2хв	1
2	95°C	0,5хв	40
	58°C	0,5хв	
	72°C	0,5хв	
3	72°C	2хв	1

Таблиця 2.

Спосіб виявлення ДНК вірусу хвороби Ауескі

Метод дослідження	Позитивно реагуючі тварини (гол.)	Негативно реагуючі тварини (гол.)
Алергічна проба	15	15
Реакція нейтралізації	12	18
ПЛР	16	14