



УКРАЇНА

(19) UA (11) 35987 (13) U
(51) МПК (2006)
A01M 1/20МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ДНК-УТРИМУЮЧИХ ВІРУСІВ

1

2

(21) u200805942

(22) 07.05.2008

(24) 10.10.2008

(46) 10.10.2008, Бюл.№ 19, 2008 р.

(72) ОБЕРЕМОК ВОЛОДИМИР ВОЛОДИМИРОВО-ВИЧ, UA

(73) ТАВРІЙСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. В.І. ВЕРНАДСЬКОГО, UA

(57) Спосіб діагностики ДНК-утримуючих вірусів, що включає відділення частини тканини організму,

виділення ДНК із тканини, її ампліфікацію з використанням праймерів, виділення фрагмента ДНК, по якому визначають наявність вірусу, який **відрізняється** тим, що виділяють ділянки тканини: здорової й ураженої вірусом, ампліфікують випадковим праймером і визначають наявність вірусу по фрагменту ДНК, виділеному із частини ураженої тканини.

Технічне рішення ставиться до області медицини й сільського господарства.

Відомий спосіб діагностики вірусу ядерного поліедроза комах [Ilyinikh A.V., Kojoev Sh.S., Petrova I.D., Ulyanova E.G., Ilyinikh Ph.A. Assessment of the remote effect of baculovirus in gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) // 25th Jubilee Assembly of East Palearctic Regional Section (Ed. J.Eke). - Budapest. - 2005. - P.89-93].

Спосіб передбачає виділення ДНК вірусу із тканини комах і подальшу її ампліфікацію з використанням 2 специфічних праймерів довжиною по 18п.н., які створюються на основі відомого геному вірусу. За допомогою двох специфічних праймерів дослідник одержує один ДНК - фрагмент, що маркує вірусну ДНК.

Даний спосіб не дозволяє діагностувати віруси ядерного поліедроза комах, послідовність геному яким не встановлена й діагностувати вірус у тих випадках, коли вірусна ДНК частково зруйнувалася або є присутнім незначна частина геному вірусу.

В основу корисної моделі поставлене завдання вдосконалити спосіб діагностики ДНК - утримуючих вірусів шляхом застосування випадкового праймера.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі діагностики ДНК - утримуючих вірусів, що включає виділення ДНК вірусу із тканини організму, її ампліфікацію з використанням праймерів, відповідно до корисної моделі, виділяють ДНК вірусу із ураженої їм тканини й ампліфікують її з використанням випадкового праймера, що забез-

печує можливість виявлення присутності ДНК вірусу або її фрагментів на різних етапах розвитку вірусної інфекції: від окультної й латентної до активної форми.

Спосіб здійснюють таким чином.

З комах відокремлюють частини здорової й ураженої тканин. Виділяють ДНК вірусу за стандартною методикою [Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: Laboratory Manual. - New York, Cold Spring Harbour Univ. Press, 1989. - 1626р.] з ураженої тканини і здорової, ампліфікують її з використанням випадкових праймерів. Уражену тканину визначають за ознаками характерним для вірусу [Гулий В.В., Рибина С.Ю. Вірусні хвороби комах і їхня діагностика. - Кишинів, 1988. - 187с.; Тарасович Л.М. Віруси комах. - М.: Наука, 1975. - 245с.]. Випадковий праймер підбирається з 28 відомих декануклеотидних праймерів серії ОРА (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 28). Генетичні розходження в тотальній ДНК, виділеної зі їй ураженої вірусом і здорової тканини визначають за допомогою випадкового праймера. Ампліфікацію ДНК проводять у реакційній суміші обсягом 29мкл на термоциклері "Терцик" (ДНК-технологія, Росія) з використанням реактивів для полімеразної ланцюгової реакції "Амплиценс-200-1" (Амплиценс, Москва). Реакційна суміш обсягом 29мкл містила: 5-х PCR-буфер - 5 МКпМgSO₄, 50МпМ - 1,5мкл; H₂O MilliQ_i - 3мкл; dNTP-mix - 2,5мкл, 2МпМ; Taq-полімераза, 50д/мкл - 0,5мкл; мінеральне масло - 10,5мкл; праймер, А₂₆₀ 100Е/мол - 1мкл; Т-буфер з дослідженої ДНК - 5мкл. RAPD-PCR проводили в режимі: денатурація

(13) U
(11) 35987
(19) UA

93°C - 1хв, відпалювання 35°C - 1хв, синтез 72°C - 1хв - 5 циклів; денатурація 93°C - 0,5хв, відпалювання 35°C - 0,5хв, синтез 72°C - 0,5хв - 40 циклів. Термінальну стадію синтезу проводили при 72°C - 3хв. Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 1,8% агарозному гелі.

Через невелику довжину праймера фрагментів ДНК звичайно багато. Найбільше, що зустрічають часто фрагменти, вірусної ДНК (консервативні ділянки) придатні для діагностики даного вірусу

Приклад 1

Для діагностики активного вірусу ядерного поліедроу непарного шовкопряда використали вірусні препарати з Киргизії, Росії, Китаю й України. Екстракцію тотальної ДНК проводили з використанням комплексу "Днк-сорб-А" варіант 100 фірми Амплісенс (по інструкції). RAPD-PCR проводили в реакційній суміші обсягом 29мкл на термоциклері "Терцик" (Днк-технологія, Росія) з використанням реактивів для полімеразної ланцюгової реакції "Амплісенс-200-1" (Амплісенс, Москва). Реакційна суміш обсягом 29мкл містила: 5-х PCR-буфер - 5мкл; MgSO₄, 50Mm - 1,5мкл; H₂O Milli - 3мкл; dNTP-mix - 2,5мкл, 2Mm; Taq-полімераза, 5ед/мкл - 0,5мкл; мінеральне масло - 10,5мкл; праймер, A₂₆₀ 100Е/мол - 1мкл; Т-буфер з дослідженою ДНК - 5мкл. RAPD-PCR проводили в режимі: денатурація 93°C - 1хв, відпалювання 35°C - 1хв, синтез 72°C - 1хв - 5 циклів; денатурація 93°C - 0,5хв, відпалювання 35°C - 0,5хв, синтез 72°C - 0,5хв - 40 циклів. Термінальну стадію синтезу проводили при 72°C - 3хв. Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 1,8% агарозному гелі. Для проведення RAPD-PCR використали праймер OPA-08 (GTGACGTAGG).

У ході RAPD-PCR з використанням праймера OPA-08 були отримані продукти ампліфікації ДНК вірусів з різних вірусних препаратів (Фіг.1). Отримані набори фрагментів ДНК вірусу можна умовно розділити на три зони: 01, 02 і 03 довжиною близько 150, 250 і 400п.н., які присутні у всіх трьох вірусних препаратах. Продукти ампліфікації мають гарну відтворюваність і їх можна використати як маркери ДНК вірусу ядерного поліедроу непарного шовкопряда. 1 - з України; 2 - з Китаю (1); 3 - з Росії; 4 - з Китаю (2); 5 - Киргизії; 6 - маркер молекулярних ваг ДНК від 200 до 1000п.о. із кроком в 100п.о.; 00, 01, 02, 03 - умовні зони продуктів ампліфікації вірусної ДНК.

Приклад 2

Для діагностики латентного вірусу ядерного поліедроу використали яйця непарного шовкопряда. Екстракцію тотальної ДНК проводили з використанням комплексу "Днк-сорб-А" варіант 100 фірми Амплісенс (по інструкції). RAPD-PCR проводили в реакційній суміші обсягом 29мкл на термоциклері "Терцик" (Днк-технологія, Росія) з використанням реактивів для полімеразної ланцюгової реакції "Амплісенс-200-1" (Амплісенс, Москва). Реакційна суміш обсягом 29мкл містила: 5-х PCR-буфер - 5мкл; MgSO₄, 50Mm - 1,5мкл; H₂O Milli - 3мкл; dNTP-mix - 2,5мкл, 2Mm; Taq-полімераза, 5ед/мкл - 0,5мкл; мінеральне масло - 10,5мкл; праймер, A₂₆₀ 100Е/мол - 1мкл; Т-буфер з дослідженою ДНК - 5мкл. RAPD-PCR проводили в режимі: денатурація 93°C - 1хв, відпалювання 35°C - 1хв, синтез 72°C - 1хв - 5 циклів; денатурація 93°C - 0,5хв, відпалювання 35°C - 0,5хв, синтез 72°C - 0,5хв - 40 циклів. Термінальну стадію синтезу проводили при 72°C - 3хв. Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 1,8% агарозному гелі. Для проведення RAPD-PCR використали праймер OPA-08 (GTGACGTAGG).

У ході RAPD-PCR з використанням праймера OPA-08 були отримані продукти ампліфікації ДНК вірусів, що перебувають на поверхні й усередині яєць, що містять умовні зони 01, 02, 03 (Фіг.2.). 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 6.1, 7.1 - досліджувалася поверхня яєць на наявність вірусної ДНК; 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2, 6.2, 7.2 - досліджувався вміст яєць на наявність вірусної ДНК; М - маркер молекулярних ваг ДНК від 200 до 1000п.н. із кроком в 100п.н.

Заявлений спосіб відрізняється тим, що замість двох специфічних праймерів використовується один випадковий. Спосіб дозволяє діагностувати віруси ядерного поліедроу комах, послідовність геному яким не встановлена, дозволяє діагностувати вірус у тих випадках, коли вірусна ДНК частково зруйнувалася або змінилася. Спосіб реалізується при наявності всіх консервативних фрагментів вірусної ДНК, при наявності їх окремо або в будь-якому сполученні й будуть маркувати наявність вірусу. Запропонований спосіб діагностики вірусу в організмі має точність і здатний виявити присутність ДНК вірусу або її фрагментів на різних етапах розвитку вірусної інфекції: від окультої й латентної до активної форми.

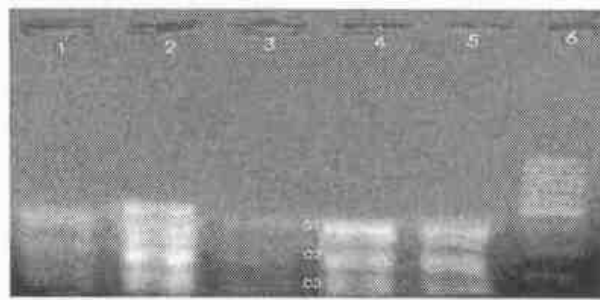


Fig. 1

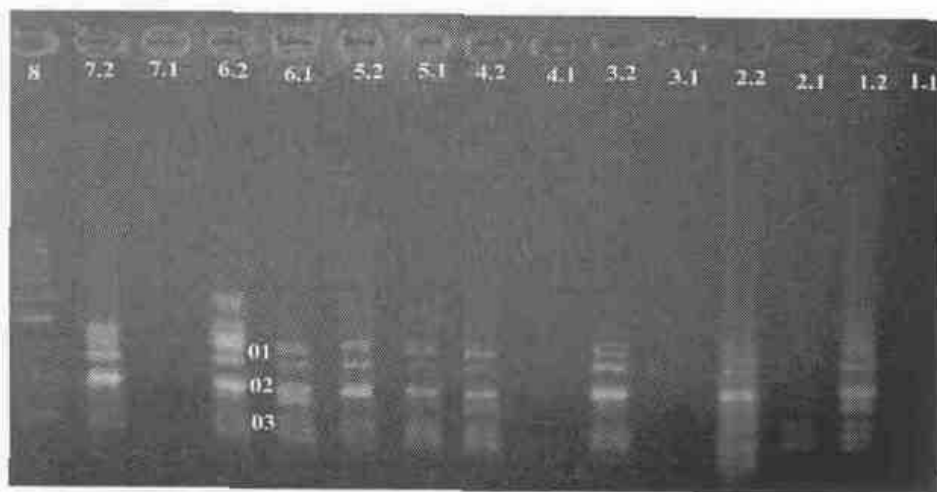


Fig. 2