



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **53223** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРИЖИТТЄВОЇ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ДВОСТАДІЙНОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЮ ЛАНЦЮГОВОЮ РЕАКЦІЄЮ

1

2

(21) u201004652

(22) 20.04.2010

(24) 27.09.2010

(46) 27.09.2010, Бюл.№ 18, 2010 р.

(72) СПИРИДОНОВ ВЛАДИСЛАВ ГЕННАДІЙОВИЧ, ІЩЕНКО ЛЮДМИЛА МАР'ЯНІВНА, МЕЛЬНИЧУК СЕРГІЙ ДМИТРОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

(57) Спосіб прижиттєвої діагностики лейкозу великої рогатої худоби двостадійною полімеразною

ланцюговою реакцією, що включає відбір зразків, екстракцію ДНК із зразків, проведення першої стадії полімеразної ланцюгової реакції, проведення другої стадії полімеразної ланцюгової реакції, візуалізацію та аналіз результатів, який **відрізняється** тим, що другу стадію проводять методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу із розробленими праймерами та флуоресцентними зондами для детекції гена ENV провірусу лейкозу та гена PRP, специфічного для великої рогатої худоби.

Корисна модель відноситься до галузі ветеринарної медицини і може бути використана для діагностики лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ) в зразках крові або інших біологічних рідинах.

Відомий спосіб діагностики лейкозу ВРХ (великої рогатої худоби) методом д.с.-ПЛР (полімеразною ланцюговою реакцією) із розділенням продуктів ампліфікації в агарозному гелі, який включає відбір зразків крові, екстракцію ДНК із зразків крові, проведення першої стадії ПЛР, проведення другої стадії ПЛР, візуалізацію результатів за допомогою розділення продуктів реакції в агарозному гелі, аналіз результатів [Office International des Epizootics (OIE) (1992). Chapter 2.3.4, Enzotic bovine leukosis, In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Second Edition, OIE, Paris, France: P. 53-63]. Спільними суттєвими ознаками відомого способу та запропонованого винаходу є відбір зразків крові, екстракція ДНК із зразків крові, проведення першої стадії ПЛР, проведення другої стадії ПЛР, аналіз результатів.

Незважаючи на широке застосування прототипу, він має ряд недоліків, які стосуються достовірності отримуваних результатів. Для візуалізації та аналізу результатів метод вимагає проведення розділення продуктів ампліфікації в агарозному гелі, що передбачає відкривання пробірок. Оскільки, продукти ампліфікації є коротколанцюговими сполуками відкривання пробірок супроводжується забрудненням робочого середовища продуктами ампліфікації, що часто призводить до контамінації наступної ПЛР та отримання псевдопозитивних результатів. Окрім того, для візуалізації продуктів

ампліфікації в агарозному гелі використовують флуоресцентний інтеркалюючий барвник - бромистий етідій, який має канцерогенні властивості.

В основу корисної моделі поставлене завдання в способі діагностики лейкозу ВРХ методом д.с.-ПЛР зменшити ризик контамінації продуктами ампліфікації, попередити отримання псевдонегативних результатів та зробити спосіб більш безпечним. Досягти збільшення точності та безпечності способу діагностики лейкозу ВРХ методом д.с.-ПЛР.

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі діагностики лейкозу ВРХ методом д.с.-ПЛР, який включає відбір зразків крові, екстракцію ДНК із зразків крові, проведення першої стадії ПЛР, проведення другої стадії ПЛР, візуалізацію та аналіз результатів, згідно корисної моделі, другу стадію ПЛР проводять в режимі реального часу.

Запропонований спосіб характеризується такими суттєвими ознаками: відбір зразків крові, екстракція ДНК із зразків крові, проведення першої стадії ПЛР, проведення другої стадії ПЛР в режимі реального часу, візуалізація та аналіз результатів. В запропонованому способі, відмінною ознакою є те, що другу стадію ПЛР проводять в режимі реального часу, що дає можливість проводити мультиплексний аналіз (одночасно в одній пробірці здійснювати детекцію двох мішеней). Для другої стадії ПЛР використовуються власні розроблені праймери та флуоресцентні зонди до двох мішеней: гену ENV провірусу лейкозу, та гену PRP, який є специфічним для ВРХ (ендогенний контроль). Ендогенний контроль слугує контролем якості та кі-

(13) **U**

(11) **53223**

(19) **UA**

лькості виділеної ДНК із лімфоцитів крові внаслідок чого попереджається отримання псевдонегативних результатів. Крім того, використання ПЛР в реальному часі не вимагає проведення розділення продуктів ампліфікації в агарозному гелі (візуалізація результатів відбувається на моніторі комп'ютеру), що попереджає контамінацію робочого середовища продуктами ампліфікації та робить спосіб діагностики лейкозу ВРХ методом д.с.-ПЛР більш безпечним.

Лейкоз (рак крові) великої рогатої худоби - це хронічне захворювання, що викликається ретровірусом лейкозу (bovine leukaemia virus, BLV). Згідно діючої «Інструкції по профілактиці та оздоровленню великої рогатої худоби від лейкозу», основними методами прижиттєвої діагностики є серологічні - реакція радіальної імунодифузії (РІД) та імуноферментний метод (ІФА), а також метод ПЛР. Міжнародне епізоотичне бюро, рекомендує здійснювати діагностику лейкозу за допомогою ПЛР в модифікації nested (двохстадійна ПЛР), яка є більш чутливою порівняно із одностадійною. Однак висока чутливість методу є одночасно і його недоліком через високий ризик контамінації робочого середовища продуктами ампліфікації. ПЛР в реальному часі - одна із сучасних модифікацій ПЛР, в основу якої покладено використання флуоресцентних барвників, що дає можливість спостерігати за накопиченням ПЛР-продукту в реальному часі на моніторі комп'ютеру, в зв'язку з чим не має необхідності проводити розділення продуктів ампліфікації в агарозному гелі.

Запропонований спосіб здійснюється таким чином: кров ВРХ відбирають із яремної, молочної чи хвостової вени в одноразові пробірки із консервантом (0,5% розчин ЕДТА) у кількості 5мл.

Виділення ДНК: відібрати необхідну кількість одноразових пробірок, включаючи негативний контроль виділення, і промаркувати їх; внести в кожну пробірку по 300мкл лізуючого буферу і 100мкл крові, (замість крові в пробірку для негативного контролю виділення внести 100мкл буферу для елюції ДНК); проби ретельно перемішати на вортексі і прогріти 5хв при 65°C; осадити краплі на вортексі; додати 25мкл сорбенту ДНК ретельно перемішати на вортексі та залишити пробірки у штативі на 2хв.; повторити процедуру та залишити

в штативі на 5хв.; осадити сорбент при 5000об/хв. протягом 30с. відібрати супернатант у колбу-уловлювач, використовуючи вакуумний насос та окремий наконечник для кожної проби; додати в зразки по 300мкл розчину для відмивання 1, перемішати на вортексі до повного ресуспендування сорбенту; осадити сорбент центрифугуванням при 5000об/хв. протягом 30с.; відібрати супернатант, використовуючи вакуумний насос та окремий наконечник для кожної проби; додати в кожну пробірку по 500мкл розчину для відмивання 2 (окремими наконечниками), ретельно ресуспендувати на вортексі і знову осадити при 5000об/хв. протягом 30с.; видалити супернатант із кожної пробірки окремим наконечником; повторити процедуру відмивання; ретельно відібрати супернатант і висушити осад сорбенту при відкритих кришках мікропробірок у термостаті при 65°C протягом 5-7хв. (до повного випаровування рідини); ресуспендувати сорбент у 50мкл буферу для елюції ДНК (ТЕ буфер), перемішати на вортексі та помістити в термостат при 65°C на 5-6хв., струшуючи на вортексі кожну хвилину; осадити сорбент на мікроцентрифузі при 13000об/хв. протягом 1хв. Супернатант містить очищену ДНК, яку використовують у ПЛР.

Проведення першої стадії ПЛР. Приготувати реакційну суміш для досліджуваних зразків із розрахунку 19,7мкл ПЛР-суміші та 0,3мкл суміші ферментів (Taq+UDG) на один зразок. 0,2мл мікропробірки для ПЛР помістити у спеціальний штатив із охолодженням та промаркувати їх; у мікропробірки за допомогою автоматичного дозатора послідовно внести по 20мкл ПЛР суміші; та додати по 5мкл виділеної ДНК кожного із зразків; у мікропробірки, які призначені для негативного контролю, внести по 5мкл реактиву «негативний контроль», який містить ДНК тварин вільних від провірусу лейкозу; у мікропробірки, які призначені для позитивного контролю, внести по 5мкл реактиву «позитивний контроль», який містить ДНК тварин у яких виявлено провірус лейкозу; в останню чергу у мікропробірки, що призначені для НТС контролю, внести по 5мкл деіонізованої води; помістити мікропробірки в ампліфікатор та задати наступний температурний профіль (табл. 1); після закінчення реакції мікропробірки відкрити на мікроцентрифузі.

Таблиця 1

Температурний профіль для першої стадії ПЛР

Стадія	Режим ампліфікації		Процес	Число циклів
	Температура, °C	Час, с		
1	50	600	активація UNG	1
2	94	600	активація полімерази	1
3	94	30	денатурація ДНК	15
	53	30	відпалювання праймерів	
	72	60	елонгація	
4	94	30	денатурація ДНК	25
	58	30	відпалювання праймерів	
	72	60	елонгація	
5	72	300	елонгація	1

Проведення другої стадії ПЛР. Приготувати реакційну суміш для досліджуваних зразків із розрахунку 22,3мкл ПЛР-суміші та 0,2мкл ферменту Таq-полімерази на один зразок; 96-лунковий планшет для ПЛР, або відповідну кількість 8-ми лункових стрипів помістити у спеціальний штатив із охолодженням; у лунки планшета за допомогою автоматичного дозатора послідовно внести по 22,5мкл ПЛР суміші та додати по 2,5мкл ПЛР-продукту першої стадії ПЛР кожного із зразків; у лунку, яку призначена для негативного контролю, внести 2,5мкл ПЛР-продукту «негативний контроль»; у лунку, яку призначена для позитивного

контролю, внести 2,5мкл ПЛР-продукту «позитивний контроль»; у одну лунку, що призначена для НТС контролю, внести 2,5мкл ПЛР-продукту «НТС» (перевірка чистоти реактивів першої стадії ПЛР); у другу лунку, що призначена для НТС контролю, внести 2,5мкл деіонізованої води (перевірка чистоти реактивів другої стадії ПЛР); включити прилад ABI Prism SDS 7000, відкрити дверцята приладу та помістити реакційний планшет у блок для зразків; відкрити програму ABI Prism 7000, створити планшетний документ, згідно настанови до приладу. задати температурний профіль (табл.2).

Таблиця 2

Температурний профіль ампліфікації для другої стадії д.с. ПЛР (сірим кольором відмічено стадію на якій здійснюється збір даних флуоресценції)

Стадія	Режим ампліфікації		Процес	Число циклів
	Температура, °C	Час, хв.		
1	94	9	активація полімерази	1
2	95	0,2	денатурація ДНК	40
	60	1	відпалювання праймерів	
	72	0,3	елонгація	

Інтерпретація одержаних результатів: основним критерієм оцінки отриманих результатів є визначення граничного циклу (Ct), що характеризує певний цикл ПЛР-РЧ, на якому спостерігається статистичне достовірне збільшення флуоресценції у порівнянні з фоновим рівнем (Фіг. Криві ампліфікації ПЛР-РЧ: позитивний зразок - крива «А» (детекція по FAM) та «Б» (детекція по JOE); негативний зразок - крива «В» (детекція по JOE) та «Д» (детекція по FAM).

Для визначення провірусної ДНК вірусу лейкозу проводиться аналіз кривих ампліфікації контроль та невідомих зразків: у позитивному контрольному зразку повинна відбуватись ампліфікація як гену-мішені (канал FAM) так і ендogenous контролю (канал JOE); у негативному контрольному зразку повинна відбуватись ампліфікація тільки ендogenous контролю (канал JOE); у НТС-контролях не повинно відбуватись ампліфікації по жодному із каналів детекції; зразок вважається позитивним, якщо відмічається ампліфікація гену-мішені (FAM)

при значенні $Ct \leq 30$ та ендogenous контролю (JOE) при значенні $Ct \leq 35$; негативним вважається зразок, у якого відмічається ампліфікація тільки ендogenous контролю (JOE) при значенні $Ct \leq 30$. Результати аналізу не враховуються: при відсутності ампліфікації по каналам FAM або JOE у позитивного контролю; при відсутності ампліфікації по каналу JOE у негативного контролю; при відсутності ампліфікації по каналу (JOE) у зразка, що досліджується, або при його ампліфікації із значенням $Ct \geq 35$; при ампліфікації по каналу FAM $Ct \geq 30$ у зразка, що досліджується. При великій розбіжності результатів (значення Ct) у повторях ($SD > 0,5$). В цих випадках проводиться повторне виділення ДНК та постановка д.с. ПЛР.

Приклад

Для вивчення чутливості д.с.-ПЛР в реальному часі порівняно із о.с.-ПЛР в реальному часі було проведено дослідження 90 зразків крові отриманих від тварин які позитивно реагували в ІФА (табл. 3).

Таблиця 3

Чутливість д.с.-ПЛР

Метод діагностики	Результат			
	позитивний	%	негативний	%
д.с.-ПЛР	90	100	0	0
о.с.-ПЛР	69	77	21	23

В результаті дослідження було отримано 69 позитивних результати в о.с.-ПЛР в реальному часі (77%), та 90 позитивних результати в (100%) в д.с.-ПЛР в реальному часі. Виходячи з результатів

дослідження можна сказати, що запропонований спосіб дозволяє виявляти на 23% більше інфікованих тварин ніж о.с.-ПЛР в реальному часі.

