

УДК: 619:616.98-07:636.4

ПІДБІР ПРАЙМЕРІВ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДУ ПЛР ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ДНК ВІРУСУ АЧС

Мандигра С. С.¹, Музикіна Л. М.¹, Іщенко Л. М.²,
Галка І. В.¹, Спиридонов В. Г.¹, Ситюк М. П.¹, Ничик С. А.¹

¹ Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ, Україна, e-mail: vet@ivm.kiev.ua

² Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК НУБіП України, м. Київ, Україна

У статті представлені результати розробки специфічних олігонуклеотидних пар праймерів для детекції ДНК вірусу африканської чуми свиней методом гніздової полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ). Проведено оптимізацію умов проведення ампліфікації.

Ключові слова: ДНК вірусу АЧС, гніздова ПЛР-РЧ, праймери

Африканська чума свиней (АЧС) – висококонтагіозна вірусна хвороба свійських і диких свиней, що перебігає у вигляді епізоотій, завдаючи величезних економічних збитків свиноводству країни та становить загрозу експортному потенціалу всього агропромислового комплексу. За відсутності специфічної профілактики та засобів лікування, своєчасна та ефективна діагностика АЧС є визначальним фактором комплексу ветеринарно-санітарних заходів боротьби з епізоотією [4–6].

На даний час зарубіжними науковцями розроблена велика кількість високочутливих і високоспецифічних методів діагностики АЧС. Особливе місце серед них займає ПЛР, що дає можливість виявити вірус АЧС усіх відомих генотипів, включаючи низьковірulentні віруси та ті, що не виявляються методом гемадсорбції [3, 6–8].

В Україні, де спалахи АЧС реєструються у більшості областей, необхідність та актуальність розробки й вдосконалення вітчизняних діагностиків є очевидна [1, 2]. Тож, науковцями ІВМ НААН було вирішено розробити тест-систему для діагностики АЧС методом гніздової (nested, двостадійної) ПЛР-РЧ, що, в порівнянні зі звичайною одностадійною ПЛР, характеризується вищою чутливістю і специфічністю.

Мета роботи – розробка специфічних олігонуклеотидних праймерів до цільової ділянки ДНК вірусу АЧС та визначення оптимальних умов проведення ампліфікації.

Матеріали та методи. В експерименті використовували патологічний матеріал свиней, що містив ДНК вірусу АЧС, а також вірусомісну суспензію культур клітин з РНК вірусу класичної чуми свиней (КЧС) – штаму «Вашингтон», РНК вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (PPCC) – штаму «*Lelystad*», ДНК цирковірусу свиней 2-го типу (ЦВС-2) – штаму «*Stoon 1010*» і ДНК вірусу хвороби Ауєскі – штаму «Петрівський-2006».

В якості позитивного контролю ПЛР-РЧ використовували плазмідну ДНК з вбудованим фрагментом геному вірусу АЧС.

ДНК з досліджуваного матеріалу виділяли методом сорбції на силікагелі з використанням комерційного набору «РИБО-сорб» (*AmpliSens*, Росія), згідно інструкцій виробника.

Дизайн специфічних олігонуклеотидних праймерів та флуоресцентних зондів проводили за допомогою програми *Primer Express (Applied Biosystem)* та бази даних *GenBank*. Аналіз і множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили з використанням комплексу програми *BLAST*.

Ампліфікацію здійснювали в режимі реального часу за допомогою приладу «*Rotor-Gene Q*», виробник «*QIAGEN Hilden*» (Німеччина).

Результати досліджень. Принцип методу гніздової ПЛР в одній пробірці полягає у температурному розділенні послідовних раундів реакції, що досягається використанням двох пар праймерів з різними температурами відпалу. Так, перший раунд проводиться при високій температурі, коли на матриці ДНК здатна відпалюватися тільки зовнішня пара праймерів, у другому раунді при значно нижчій температурі працює внутрішня пара праймерів. Тому ключовим етапом розробки діагностичного набору був підбір праймерів, що здійснювався за наступними параметрами: довжина праймерів повинна складати 17–28 нуклеотидів; процентний вміст G + C пар – 40–60 %; відсутність ймовірності утворення димерів і неспецифічного зв'язування з матрицею; різниця температур відпалу між зовнішньою і внутрішньою парою праймерів – 10 °С.

В якості внутрішньої пари праймерів було вирішено використати рекомендовані Міжнародним епізоотичним бюро (МЄБ) праймери до цільової консервативної ділянки гену B646L, розміром 250 пар нуклеотидів (п. н.), що кодує білок P72. Вони були розроблені D. P. King ще у 2003 році [8].

На основі проведеного аналізу нуклеотидної послідовності гену B646L, знайденої у базі даних *GenBank*, обрано фрагмент гену, що вміщував вищезазначену цільову ділянку. За допомогою програми *Primer Express* була підібрана зовнішня пара праймерів до обраного фрагменту гена, розміром 580 п. н. Перевірка послідовності праймерів на специфічність здійснена за допомогою програми *BLAST* підтвердила їх 100 % гомологію до гену B646L.

TaqMan зонд, рекомендований МЄБ для детекції цільового фрагменту ДНК вірусу АЧС, було удосконалено шляхом заміни гасника *TAMRA* (6-карбокситетраметил-родамін) на RTQ1, що в порівнянні з іншими молекулами гасника забезпечує у 1,5–2 рази вище поглинання флуоресценції барвників *FAM* і *ROX*, сприяючи цим підвищенню специфічності діагностука.

З метою контролю якості екстракції ДНК та виключення наявності інгібіторів у досліджуваному матеріалі, було розроблено праймери та флуоресцентний зонд до гену *PRP*, який є специфічним для свиней (внутрішній контроль).

Зазначені пари олігонуклеотидних праймерів і *TaqMan* зондів були синтезовані за нашим замовленням у компанії «*Thermo Electron Corporation*» (*Germany*).

Оптимізація умов реакції включала: пошук оптимальної температури відпалу для кожної пари праймерів, визначення оптимального складу реакційної суміші і кількості праймерів.

Специфічність і чутливість ПЛР можуть значно варіювати в залежності від якості і концентрації п'яти основних компонентів реакційної суміші (ДНК-матриці, *Taq*-полімерази, праймерів, іонів Mg^{2+} і дНТФ), а також від температурного режиму.

На підставі підібраних, в процесі оптимізації ПЛР, параметрів часу і температур для всіх стадій ампліфікації, був обраний режим проведення ПЛР, що представлений у табл. 1.

Таблиця 1 – Умови ампліфікації ДНК вірусу АЧС

№ з/п	Етапи	Температура, °С	Час	Кількість циклів
1	Початкова денатурація ДНК	95	10 хв	1
2	Денатурація ДНК	95	15 с	10
	Відпалювання зовнішньої пари праймерів	68	60 с	
3	Денатурація ДНК	95	15 с	30
	Відпалювання внутрішньої пари праймерів	58	60 с	

Після того як були визначені оптимальні часові і температурні умови ампліфікації, проводили дослідження з оптимізації вмісту компонентів в реакційній суміші.









Зміни компонентного складу реакційної суміші впливають на якість та кількість виходу ампліфікату.

Одним з важливих компонентів буферу є хлорид магнію, який необхідний для підтримки активності *Taq*-полімерази. Концентрація $MgCl_2$ також впливає на відпал праймерів і денатурацію зразка. Однак його надлишок може викликати утворення неспецифічних продуктів. $Tris-HCl$ забезпечують необхідну йонну силу і рН суміші. Так, підбір оптимальних концентрацій $MgCl_2$ і рН буферу може сприяти зменшенню виходу неспецифічного продукту ампліфікації і збільшенню виходу цільового фрагменту ДНК. Оптимальні концентрації перерахованих вище сполук підбиралися емпіричним шляхом в процесі оптимізації умов реакції.

У результаті проведених досліджень нами було підбрано оптимальний склад реакційної суміші загальним об'ємом 20 мкл, що містить: 10,0 мМ $Tris-HCl$ (рН 8,3), 50,0 мМ KCl , 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,25 мМ кожного з дНТФ, по 2,5 пМ зовнішніх праймерів, по 20 пМ внутрішніх праймерів, по 5,0 пМ праймерів для детекції гену, специфічного для свиней, 5,0 пМ флуоресцентно міченого зонду для детекції фрагменту ДНК вірусу, 2,5 пМ флуоресцентно міченого зонду для детекції гену, специфічного для свиней, 2 од. *Taq* ДНК-полімерази. Об'єм екстрагованої ДНК становить 5,0 мкл.

Специфічність праймерів визначали шляхом проведення ампліфікації виділеної з патологічного матеріалу ДНК вірусу АЧС, а також РНК та ДНК вірусів, що викликають подібні з АЧС симптоми: КЧС, РРСС, ЦВС2, хвороби Ауескі (Табл. 2).

Таблиця 2 – Умови ампліфікації ДНК вірусу АЧС

№.	Колір	Назва досліджуваного матеріалу	Ct по FAM	Ct по JOE
1		К+	8,83	
2		К-		
3		В- (негативний контроль виділення)		14,06
4		виділена ДНК вірусу АЧС з патматеріалу свині	10,16	13,22
5		виділена РНК вірус КЧС (штам «Вашингтон») з культури клітин		14,96
6		виділена РНК вірус РРСС (штам «Lelystad») з культури клітин		15,60
7		виділена ДНК ЦВС-2 (штам «Stoon 1010») з культури клітин		15,34
8		виділена ДНК вірусу хв. Ауескі (штам «Петрівський-2006») з культури клітин		14,22

За допомогою запропонованого методу специфічний ПЛР-продукт був отриманий тільки у пробах, що містив вірус АЧС, перехресних реакцій з ДНК і РНК інших збудників не спостерігалось, що свідчить про високу специфічність підібраних праймерів (Рис. 1).

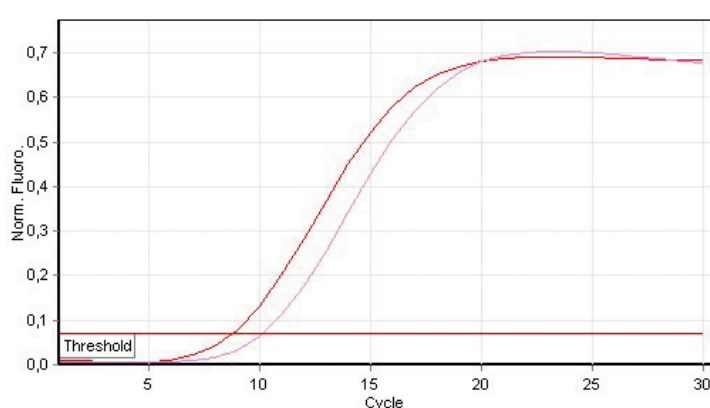


Рис. 1. Результати визначення специфічності праймерів у одному повторі. Криві ампліфікації цільової послідовності вірусу АЧС за FAM

Висновки та перспективи подальших досліджень. Підібрані специфічні праймери та флуоресцентні зонди до цільової нуклеотидної послідовності гену B646L, що кодує білок P72 вірусу АЧС. Оптимізовано параметри проведення гніздової ПЛР-РЧ, призначеної для детекції ДНК збудника АЧС.

У подальшому плануємо провести валідацію розробленого діагностикума, за результатами якої матимемо підстави рекомендувати нашу розробку для впровадження в лабораторіях ветеринарної медицини з метою діагностики АЧС.

Список літератури

1. Аналіз епізоотичної ситуації з африканської чуми свиней в Україні за 2012–2016 рр. / М. П. Ситюк, Г. А. Коваленко, І. В. Галка, та ін. // Ветеринарна біотехнологія. – Вип. 29. – 2016. – С. 241-248.
2. Випадки АЧС в Україні з 2012 року. [Електронний ресурс] / <http://www.asf.vet.ua/index.php/purpose-project/about-asf/198-vypadky-achs-v-ukraini-z-2012-roku>.
3. Діагностичні схеми використання лабораторних методів при африканській чумі свиней / О. М. Неволько, М. І. Сушко, М. А. Сапачова, Л. В. Марущак, С. О. П'ятенко // Ветеринарна біотехнологія. – № 25. – 2014. – С. 67-70.
4. Інструкція щодо профілактики та боротьби з африканською чумою свиней, затверджена Міністерством аграрної політики та продовольства України 05.03.2014 № 81.
5. African swine fever: a global view of the current challenge / C. Gallardo, A.T. Reoyo, J. Fernández-Pinero, et al // Porcine Health Management. – 2015. – 14 p.
6. African swine fever. OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.8.1. – 2008. – P.1069–1082 –Retrieved from: http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.08.01_ASF.pdf.
7. Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus / M. Tignona, C. Gallardo, C. Iscaro, et al // Journal of Virological Methods. – Vol. 178 – 2011. – P. 161–170.
8. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus / D.P. King, S.M. Reid, G.H. Hutchings, et al // Journal of Virological Methods. 2003 – Vol. 107(1). – P. 53-61.

SELECTION OF PRIMERS AND OPTIMIZATION OF PCR CONDITIONS FOR ASFV DNA DETECTION

Mandygra S. S.¹, Muzykina L. M.¹, Ishchenko L. M.², Halka I. V.¹, Spirydonov V. G.¹, Sytjuk M. P.¹, Nychyk S. A.¹

¹ Institute of Veterinary Medicine of NAAS, Kyiv, Ukraine

² Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products of NULES of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The article contains results of specific oligonucleotide primer pairs development and optimization of the nested PCR in real time for the detection of African swine fever virus (ASFV) DNA.

The aim of the work was to develop of specific primers to the target DNA fragment of ASFV and to determine the optimal conditions of the amplification.

Materials and methods. Pathological material with ASFV, cell cultures containing closely related viruses and the plasmid DNA with integrated ASFV genome fragment were used in the study. «RIBO-Sorb» (AmpliSens, Russia) was used for DNA extraction. Amplification was performed using Rotor-Gene 6000Q («QIAGEN Hilden», Germany). The nucleotide sequence of primers were designed through Primer Express software (Applied Biosystems).

Results. An external pair of primers to the target 580 bp fragment of ASFV B646L gene were selected using Primer Express. The OIE primers for real-time PCR were used as the inner primers pair. With the purpose to control DNA extraction and exclude the presence of PCR inhibitors, an internal control was constructed and specific primers with fluorogenic probe were also designed.

Primer annealing temperatures and optimal concentrations of buffer solution, Taq DNA Polymerase and dNTP were optimized. The specificities of the primer pairs were determined with pathogens of CSF, PCV2, PRRS and Aujeszky's disease. The cross-reactions with closely related DNA and RNA viruses were not observed.

Conclusions. Specific primer pairs and TaqMan probes for the conserve regions of ASFV B646L gene were developed. The conditions of amplification were determined for the nested real-time PCR for the ASFV DNA detection.

Keywords: DNA of ASFV, nested real-time PCR, primers