

ДЕТЕКЦІЯ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ ЦИРКОВІРУСУ СВИНЕЙ II ТИПУ МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЇ ІЗОТЕРМАЛЬНОЇ АМПЛІФІКАЦІЇ (LAMP)

Рудова Н. Г., Солодянкін О. С., Герілович А. П.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: rudovanatawa@ukr.net

Для детекції ЦВС-II розроблено достатню кількість молекулярно-генетичних на основі класичної ПЛР та ПЛР у реальному часі. Проте, ці методи потребують використання дорогого обладнання, теплових циклів для ампліфікації та чималої кількості часу для виконання дослідження. Метою нашої роботи було розробити альтернативний метод детекції ЦВС-II на основі ізотермальної ампліфікації, який характеризується високою швидкістю та економічністю аналізу. Нами було розроблено систему праймерів на основі таргетної послідовності гену *sar* для детекції цирковірусу свиней II типу та проведено оптимізацію протоколу ампліфікації. Ампліфікація відбувалась протягом 60 хвилин на водяній бані, а результат можна було спостерігати в УФ-світлі з використанням транслюмінатора шляхом додавання барвника SYBR green I до реакційної суміші. Розроблена нами система праймерів для детекції генетичного матеріалу ЦВС-II методом петлевої ізотермальної ампліфікації (LAMP) показала високу чутливість та специфічність. Метод LAMP, заснований на використанні системи праймерів, розробленої з урахуванням молекулярно-генетичних особливостей ЦВС, може суттєво доповнити, розширити спектр існуючих методик молекулярно-генетичного скринінгу ЦВС-II

Ключові слова: ЦВС-II, петлева ізотермальна ампліфікація, система праймерів

Цирковірусна інфекція свиней за останні 30 років (з 1991 р.) значно поширилась у всьому світі. Результати епізоотологічних досліджень, проведених у різних країнах світу, свідчать про широке розповсюдження цирковірусу серед свинопоголів'я [1].

Імуносупресуюча активність цирковірусу свиней II типу (ЦВС-II) робить організм тварин більш сприятливим до інших патогенів [2].

У даний час для детекції ЦВС-II широко використовують молекулярно-генетичні методи — класичну ПЛР та ПЛР у реальному часі. Проте, ці методи мають деякі обмеження, а саме: використання теплових циклів для ампліфікації (30–40 циклів), використання дорогого обладнання та брак часу в умовах необхідності швидкої постановки діагнозу [3].

Відсутність достатнього фінансування обмежує впровадження сучасних методів аналізу в українських діагностичних лабораторіях, що, у свою чергу, спонукає до пошуку інших альтернативних методів, які характеризуються високою швидкістю та економічністю аналізу. Альтернативним методом діагностики інфекційних захворювань тварин є петлева ізотермічна ампліфікація (LAMP).

Метод LAMP уперше був розроблений у 1998 р. співробітниками компанії Eiken Chemical Company (Японія). Цей метод характеризується використанням чотирьох-шести спеціально підібраних праймерів, розроблених для розпізнавання від шести до восьми ділянок цільового гена, а ампліфікація протікає при постійній температурі з використанням ДНК-полімерази з активністю витіснення ланцюга. Це забезпечує високу ефективність та специфічність ампліфікації, а ДНК ампліфікується за 15–60 хвилин у залежності від кількості пар праймерів, що використовуються у реакції [4, 5].

При цьому, у ході реакції LAMP утворюється велика кількість побічного продукту — пірофосфату магнію, що призводить до появи білого осаду в реакційній суміші. Оскільки збільшення помутніння реакційної суміші корелює з кількістю синтезованої ДНК, це робить можливим візуалізацію напрацювання ПЛР-продукту навіть у реальному часі шляхом вимірювання каламутності реакційної суміші [4].

Типовою картиною результатів електрофоретичного аналізу ПЛР-продукту є утворення «сходинок», оскільки під час реакції за методом LAMP формуються амплікони різного розміру, що складаються з почергових інвертованих повторів послідовності-мішені на тому ж ланцюзі. [4, 5].

У світовій практиці метод петлевої ізотермічної ампліфікації застосовувався дослідниками для ідентифікації та диференціації різних патогенних мікроорганізмів, зокрема, *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* та ряду інших бактерій, а також збудників вірусних захворювань людини та тварин [3].

Китайськими науковцями були розроблені системи праймерів для детекції методом LAMP генетичного матеріалу цирковірусів свиней II типу, які циркулюють переважно на території Китаю [6, 7].

Але, зважаючи на високу мінливість ЦВС-II та варіабельність його генотипів, що циркулюють у різних регіонах світу [8], не існує універсального методу детекції генетичного матеріалу цього збудника. Тому, важливим для розробки простого і, водночас, достатньо чутливого методу діагностики цирковірусу свиней II типу на основі петлевої ізотермальної ампліфікації, адаптованого до місцевих умов, є урахування цих факторів.

Мета досліджень. Метою наших досліджень була розробка системи праймерів для детекції генетичного матеріалу ЦВС-II методом LAMP на основі даних молекулярно-генетичної структури вірусів, ізольованих на території східної Європи.

Матеріали і методи. Для відпрацювання методики були використані зразки клінічного матеріалу від свиней — клінічно здорових і позитивних щодо наявності генетичного матеріалу ЦВС-II, а також розплодки штамів інших вірусів в якості гетерологічних зразків.

Екстракцію нуклеїнових кислот з досліджуваних зразків здійснювали за методом афінної сорбції. Для проведення ПЛР у звичайному форматі використовували базові набори «Maxima Hot Start Green PCR Master Mix» виробництва фірми Thermo Scientific (Литва) та систему праймерів PCV2_F/R з використанням температури відпалу відповідно до затвердженої методики [9].

Обрання таргетних генів для розробки праймерних систем здійснювали за аналізом послідовностей з різних географічних зон, наявних у базах даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Розробку системи праймерів виконували за допомогою інтернет-сервісу PrimerExplorer (V.3) у режимі онлайн. Дослідження теоретичної якості розроблених праймерів виконували з використанням алгоритму BLAST [10].

Реакцію петлевої ізотермальної ампліфікації проводили за допомогою реагентів виробництва фірми Thermo Fisher Scientific (Німеччина) і BioLabs (Великобританія) у відповідності до рекомендацій виробників цих наборів.

Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації проводили в 1,5 %-му агарозному гелі, забарвленому бромистим етидієм, за напруги електричного поля $U=120$ В протягом 45 хв. Подальшу візуалізацію здійснювали в УФ-світлі з використанням транслюмінатора. Також для візуалізації флуоресценції з метою контролю напрацювання ДНК використовували барвник SYBR green I у концентрації 1 X, який додавали безпосередньо до пробірок, які потім вносили до транслюмінатора.

Результати досліджень. З метою розробки системи праймерів для детекції цирковірусу свиней II типу методом петлевої ізотермальної ампліфікації необхідно було обрати таргетний ген та провести його біоінформатичний аналіз.

Дані літературних джерел та результати досліджень, проведених науковцями закордонних країн, вказують на те, що геном цирковірусу свиней II типу містить лише два гени, які кодуєть первинну структуру реплікативного протеїну (*rep*-ген) і капсидного протеїну (ген *cap*). Решта генетичного матеріалу вірусу являє собою некодуючі області, котрі фланкують означені гени [11].

Аналіз літературних джерел показав, що для розробки праймерних систем для методу LAMP науковці використовують секвеновану послідовність вірусу, актуального для даної місцевості [12].

Зважаючи на це, було проведено філогенетичний аналіз ізолятів цирковірусів свиней II типу на основі раніше секвенованих послідовностей гену *rep* ЦВС-II [13]. За результатами біоінформатичного аналізу з використанням алгоритму BLAST були вибрані послідовності вірусів ЦВС-II, ізольованих на території східної Європи, найбільш ідентичні гену *rep* (421 п. н.). Найбільш придатною для розробки системи праймерів, на нашу думку, виявилась послідовність капсидного протеїну цирковірусу свиней II типу, виділеного у Словаччині (KP768467.1 штам 2333-SE).

На основі цієї таргетної послідовності при користуванні опцією програмного забезпечення PrimerExplorer 3 у режимі on-line (<http://primerexplorer.jp/e/>) було сконструйовано 36 систем праймерів. Обрання праймерів з числа запропонованих програмою здійснювали з урахуванням

ключових факторів, здатних впливати на якість реакції: Т_m, стабільність кінців кожного з праймерів, вміст GC та здатність до утворення вторинних структур.

За результатами біоінформатичної розробки було обрано пари праймерів, які теоретично задовольняли усі вимоги до їх якості. Перевірка теоретичної якості розробленої нами системи праймерів з використанням алгоритму BLAST встановила, що обрані олігонуклеотидні послідовності комплементарні та теоретично можуть гібридизуватись з 132 секвенованими послідовностями ізолятів ЦВС-II, виділених у різних країнах світу. Ідентичність олігонуклеотидних послідовностей до матриці складала 100 %. Отже, розроблена система праймерів за результатами теоретичних біоінформатичних методів дослідження відповідала всім необхідним вимогам (табл.).

Таблиця — Система праймерів для детекції ЦВС-II методом LAMP

Назва праймера	Позиція в геномі	Нуклеотидна послідовність (5'→3')
PCV-F3	267–290	CTCTATACCCTTTGAATACTACAG
PCV-B3	458–475	GGGAGTGGTAGGAGAAGG
PCV-FIP	348–367, 306–323	TAGCACTGGATCCAACTCCC-GGTTGAATTCTGGCCCTG
PCV-BIP	378–402, 432–449	TGACAACCTTTGTAATAAAGGCCACA-ATTGTATGGCGGGAGGAG

З метою апробації розробленої системи праймерів використовували зразки ДНК від свиней, які за результатами попереднього дослідження виявилися позитивними щодо наявності генетичного матеріалу ЦВС-II.

LAMP проводили на водяній бані та з використанням програмованого ампліфікатора (Biometra, Німеччина). Посилаючись на результати досліджень розробників методу та закордонних науковців [4–7], нами були оптимізовані концентрації компонентів реакційної суміші в загальному обсязі реакції 25 мкл: зовнішніх і внутрішніх праймерів, дезоксинуклеозидів, MgSO₄, Bst-полімерази та води. Реакційну суміш інкубували при 55–65 °C протягом 60 хв, а потім нагрівали при 80 °C протягом 5 хв для припинення реакції (за використання ампліфікатору), або не нагрівали (за використання водяної бані).

Напрацювання ПЛР-продукту методом LAMP можна було отримати при температурах у діапазоні 58–63 °C протягом 60 хв. Для подальших досліджень нами було обрано показник температури 58 °C.

Після ампліфікації при проведенні електрофоретичного аналізу ПЛР-продуктів в агарозному гелі було встановлено наявність специфічних смуг у вигляді шлейфів і «сходинок» у зразках, позитивних щодо наявності генетичного матеріалу ЦВС-II. У зразку, що містив бідистильовану воду в якості негативного контролю, ПЛР-продукт не утворювався (рис. 1).

Ті ж самі зразки після додавання барвника SYBR green I до реакційної суміші були опромінені в ультрафіолетовому світлі на трансільюмінаторі. Зразки, позитивні щодо наявності ДНК ЦВС-II, в залежності від обраного кольорового фільтру давали флюоресценцію на відміну від негативного контролю ампліфікації (рис. 2).

За даними дослідників, можливий випад осадку та помутніння реакційної суміші, що видно неозброєним оком, але у нашій роботі ми не спостерігали цього явища.

Для оцінювання чутливості розроблених праймерів вивчали можливість виявлення різної кількості специфічної ДНК. Для цього проводили розведення зразку ДНК ЦВС-II (зразок № 8, рис. 1) водою, очищеною від нуклеаз, у співвідношенні: 1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000, 1:1 000 000.

За результатами електрофоретичного аналізу було встановлено, що розроблені нами праймери були здатні виявляти навіть незначну кількість ДНК ЦВС-II (при розведенні 1:1 000 000), що говорить про високу чутливість методики (рис. 3).

З метою визначення специфічності розроблених нами праймерів була сформована панель гетерологічних зразків ДНК. Для цього використовували ДНК, виділену зі зразків вірусу хвороби Ауескі (шт. «Барта»), парвовірусу свиней (шт. «К-5»), зразку культури РК-15 та крові клінічно здорової свині. Для контролю використовували зразок ДНК ЦВС-II.

За результатами цих досліджень встановлено, що у зразку, позитивному щодо наявності генетичного матеріалу ЦВС-II, спостерігалось утворення специфічного ПЛР-продукту, тоді як у

зразках гетерологічних матриць ПЛР-продукт не утворювався. Була встановлена відсутність перехресної реакції системи праймерів із генетичним матеріалом цирковірусу свиней I типу (ЦВС-I), вірусу хвороби Ауескі, парвовірусу свиней (ПВС), а також з генетичним матеріалом організму хазяїна за тих самих умов реакції (рис. 4).

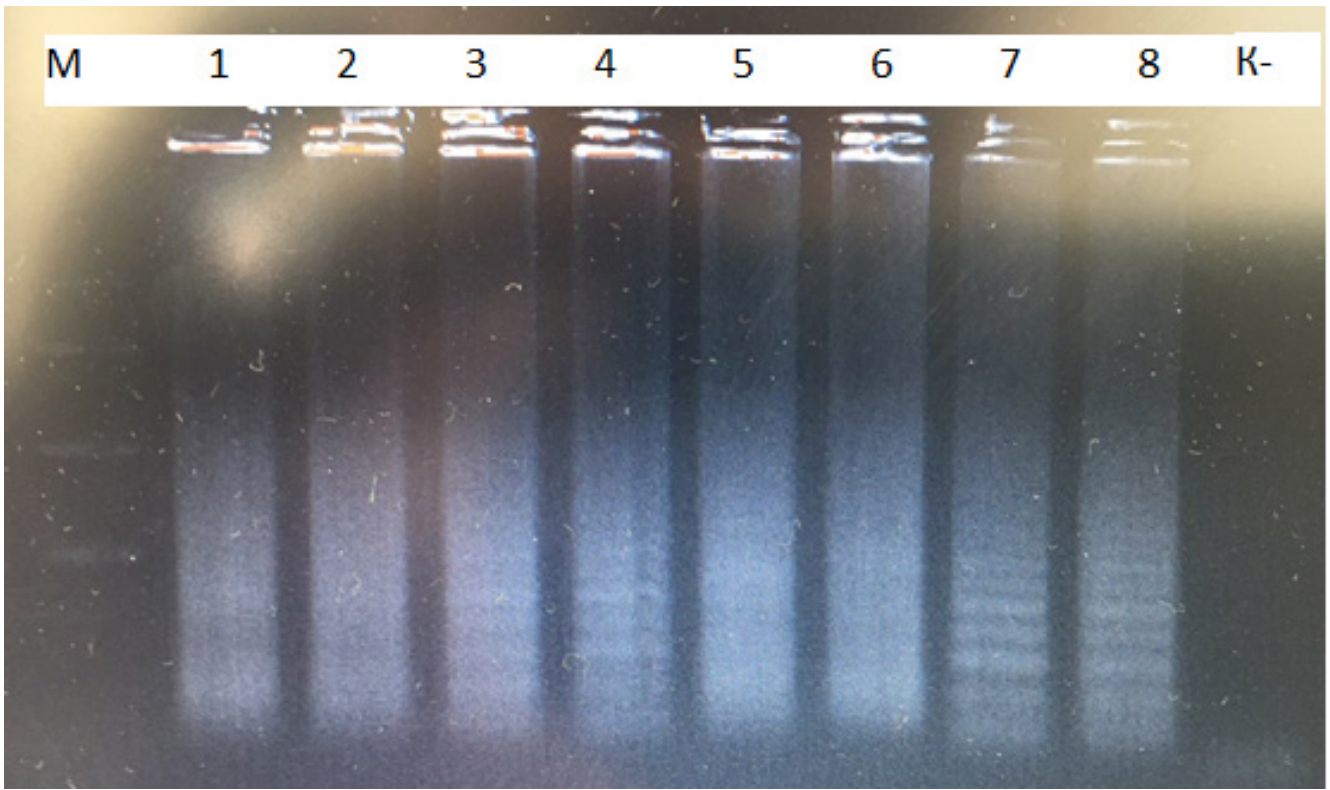


Рис. 1. Результати електрофоретичного аналізу в 1,5 %-му агарозному гелі (типова картина електрофорезу ампліфікованого продукту): М — маркер молекулярної маси; 1–8 — досліджувані зразки; К⁻ — негативний контроль.

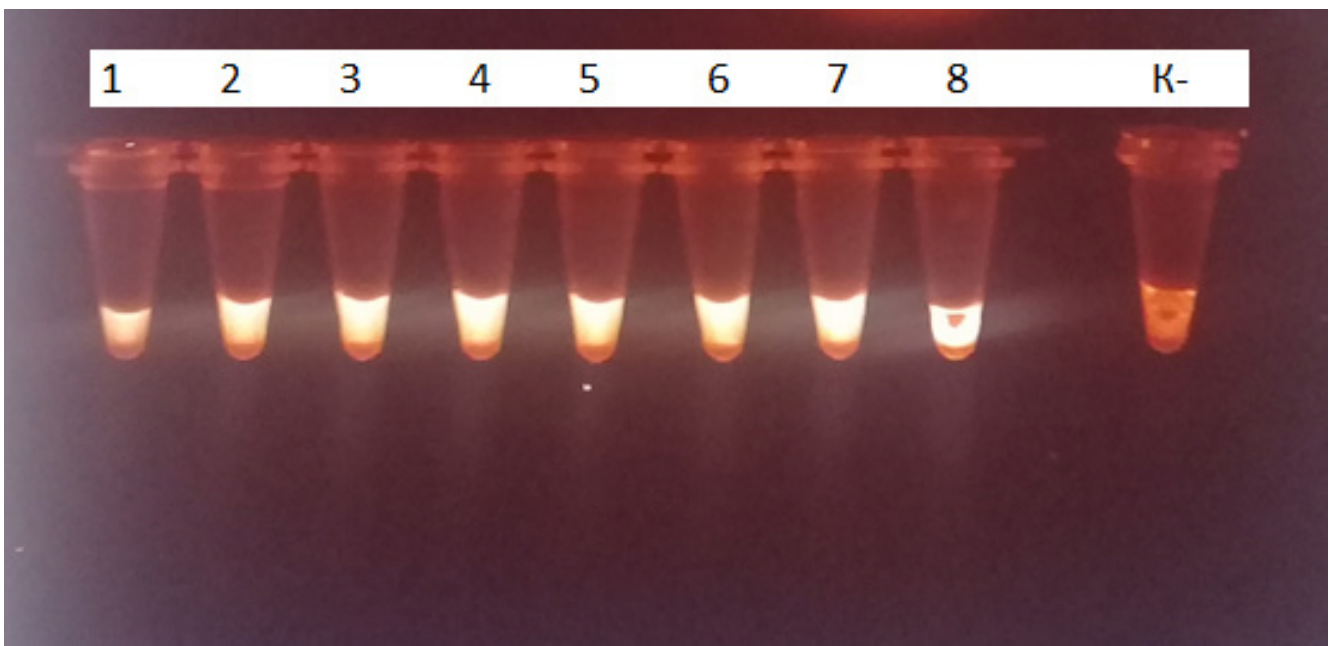


Рис. 2. Візуалізація результатів LAMP за допомогою УФ-опромінювання та після додавання барвника SYBR green до реакційної суміші: 1–8 — досліджувані зразки; К⁻ — негативний контроль.

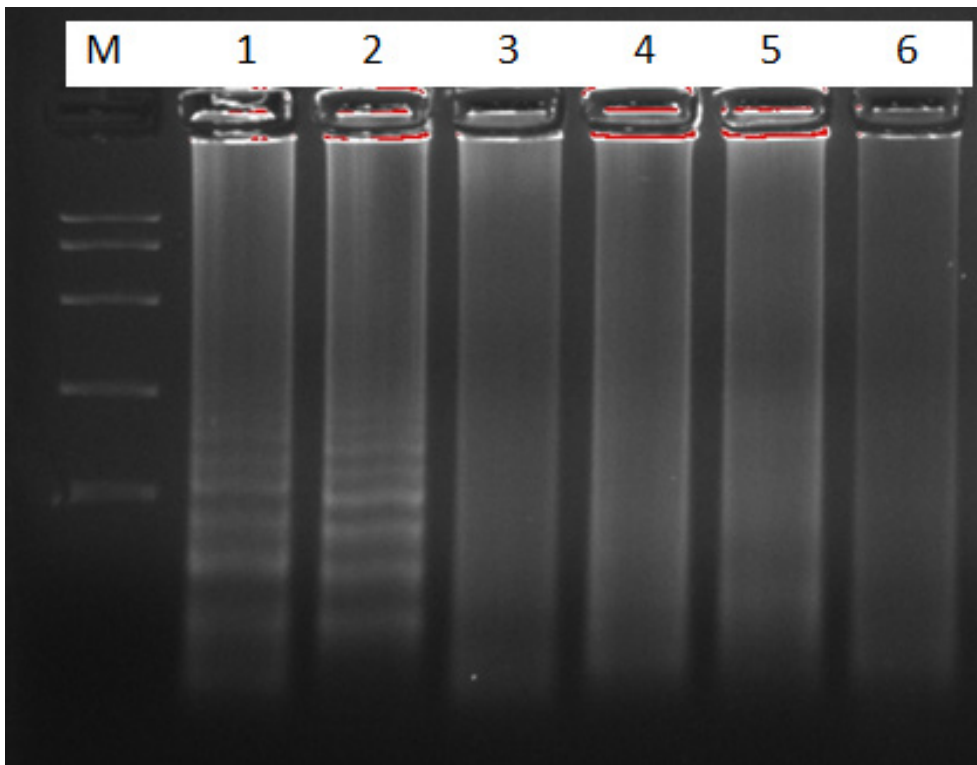


Рис. 3. Результати електрофоретичного аналізу чутливості розробленої системи праймерів в 1,5 %-му агарозному гелі: М — маркер молекулярної маси; 1–6 — досліджуваний зразок у розведеннях: 1 — 1:10, 2 — 1:100, 3 — 1:1 000; 4 — 1:10 000; 5 — 1:100 000; 6 — 1:1 000 000.

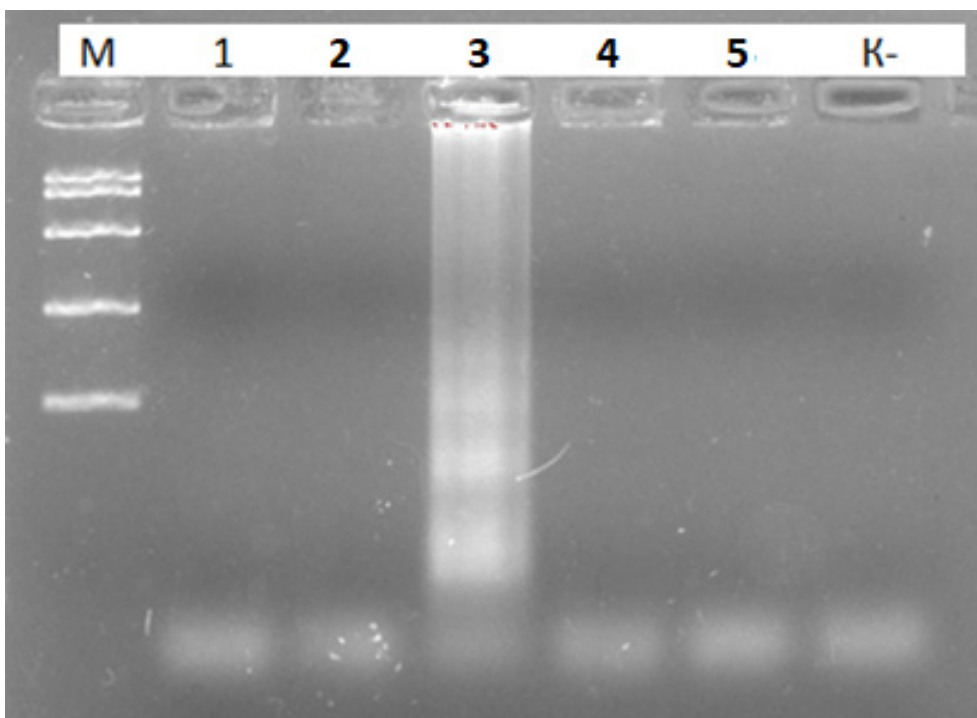


Рис. 4. Результати електрофоретичного аналізу в 1,5 %-му агарозному гелі: М — маркер молекулярної маси; 1–5 — досліджувані зразки: 1 — зразок РК-15 (ЦВС-I); 2 — зразок ДНК із крові клінічно здорової свині; 3 — зразок ЦВС-II; 4 — ДНК вірусу хвороби Ауескі; 5 — ДНК парвовірусу свиней; К⁻ — негативний контроль.

Відсутність гібридизації системи праймерів з матрицею, виділеної від інтактною свині або інших вірусів свідчить про специфічність розробленої системи праймерів.

Висновки. Розроблена система праймерів для детекції генетичного матеріалу ЦВС-II методом петлевої ізотермальної ампліфікації (LAMP) показала високу чутливість та специфічність. Ампліфікація відбувалась протягом 60 хвилин на водяній бані, а результат можна було спостерігати в УФ-світлі з використанням транслюмінатора шляхом додавання барвника SYBR green I до реакційної суміші. Метод виявлення ДНК ЦВС-II з використанням LAMP є менш трудомістким у порівнянні з класичною ПЛР і доступним для відтворення у діагностичних лабораторіях в умовах відсутності спеціального обладнання (ампліфікаторів) або приладів для проведення електрофорезу.

Перспективи подальшого використання отриманих результатів. Метод LAMP, заснований на використанні системи праймерів, розробленої з урахуванням молекулярно-генетичних особливостей ЦВС, може суттєво доповнити і розширити спектр існуючих методик молекулярно-генетичного скринінгу ЦВС-II та може бути використаний як додатковий інструмент діагностики та ефективного контролю цирковірусної інфекції свиней.

Список літератури

1. Неволько О. М., Ситюк М. П.. Результати серологічних моніторингових досліджень щодо цирковірусної інфекції серед свійських свиней на території України за період 2010–2012 рр. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2013. Вип. 12. С. 40–45.
2. Segales J. [et al.]. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Veterinary Microbiology*. 2004. Vol. 98, No. 2. P. 151–158.
3. Keikha M. LAMP method as one of the best candidates for replacing with PCR method. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 2018. Vol. 25, No. 1. P. 121–123.
4. Notomi T. [et al.]. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000. Vol. 28, No. 12. P. e63.
5. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*. 2002. Vol. 16, No. 3. P. 223–229.
6. Chen H. [et al.]. Rapid detection of porcine circovirus type 2 by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*. 2008. Vol. 149, No. 2. P. 264–268.
7. Zhou S. [et al.]. Loop-mediated isothermal amplification for detection of porcine circovirus type 2. *Virology Journal*. 2011. Vol. 8, No. 1. P. 497.
8. Franzo G., Segalés J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PLoS one*. 2018. Vol. 13, No. 12. P. e 0208585.
9. Стегній Б. Т. [та ін.]. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях : наук.-метод. посібник. Харків, 2010. 228 с.
10. Altschul S. F. [et al.]. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990. Vol. 215, No. 3. P. 403–410.
11. Ситюк М. П. [та ін.]. Цирковірусні інфекції. Київ: Аграрна наука, 2017. 128 с.
12. Parida M. [et al.]. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*. 2008. Vol. 18, No. 6. P. 407–421.
13. Gerilovych A. P., Stegnyy B. T., Rudova N. G., Buzun A. I.. Study of the genetic variability of the porcine circovirus type 2 in Ukraine. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. 2015. Vol. 1, No. 2. P. 25–31.

DETECTION OF GENETIC MATERIAL OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE II BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP)

Rudova N. G., Solodiantkin O. S., Gerilovych A. P.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

There is a sufficient number of molecular-genetic methods for the Porcine Circovirus type II (PCV-II) detection, based on conventional or real-time PCR. However, these methods require expensive equipment, heat cycles for amplification, and considerable time to perform the study. The aim of our work was to develop an alternative method of the PCV-II detection based on isothermal amplification (LAMP), which characterized by cost-effectiveness and short time of study performing. By this reaction a few copies of DNA to 10⁹ molecules might be amplified in about one hour at a constant temperature which is suitable for the field conditions. We designed a set of primers using the target cap gene sequence with the further parameters optimizing of the amplification protocol. Amplification was performed for 60 minutes in a water bath, and the result was observed in UV light using a transilluminator by the adding SYBR green I to the reaction mixture. The elaborated set of primers for LAMP showed high sensitivity and specificity. The set of primers was designed to take into account the molecular genetic features of PCV, and it can significantly expand the range of existing molecular genetic screening techniques for PCV –II detection

Key words: PCV-II, loop-mediated isothermal amplification, set of primers