

ЕКСПРЕС-МЕТОДИКА ДЕТЕКЦІЇ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ ЦВС-II У ПОЛЬОВИХ УМОВАХ

**Рудова Н. Г., Ісаков М. М., Лиманська О. Ю.,
Болотін В. І., Солодянкін О. С., Герілович А. П.**

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

Метою даної роботи було провести адаптацію розробленого нами методу детекції генетичного матеріалу ЦВС-II для використання у польових умовах за відсутності лабораторного обладнання та належних умов роботи. Для відпрацювання методики використовували зразок печінки від свині, охарактеризований як позитивний щодо наявності генетичного матеріалу ЦВС-II. Екстракцію нуклеїнової кислоти проводили з використанням експрес-методу власної модифікації. Реакцію ізотермічної ампліфікації проводили за допомогою реагентів виробництва фірми Thermo Fisher Scientific (Німеччина) та BioLabs (Великобританія) у відповідності до рекомендацій виробників з використанням системи праймерів PCV-F3, PCV-B3, PCV-FIP, PCV-BIP. Для проведення ізотермічної ампліфікації використовували водяну баню WB-4MS (Biosan, Латвія) та термобіореактор ємністю 380 мл (ZIZ, Україна). Для ліофілізації реакційної суміші використовували ліофілічну сушку ALPHA 1-2 LD plus виробництва Christ (Німеччина). Температуру реакції відслідковували за допомогою термометру ТТЖ-М (ПрАТ «Склоприлад», Україна), реєстрацію температури проводили за допомогою логгера SterilDisk (Tecnosoft, Італія). Для візуалізації та контролю результатів ізотермічної ампліфікації використовували транслюмінатор Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США), інтеркалюючий барвник SYBR Green I виробництва Invitrogen (США) та портативне джерело ультрафіолетового світла (YATO, Польща). На прикладі ідентифікації ЦВС-II проведено адаптацію раніше розробленого методу ізотермічної ампліфікації для використання в польових умовах. Розроблена методика ізотермічної ампліфікації є спрощеною технічно та не потребує використання спеціального лабораторного обладнання

Ключові слова: ДНК, ПЛР, термобіореактор, УФ-ліхтарик

На сьогоднішній день серед зареєстрованих в Україні та світі інфекційних захворювань свиней, що завдають значних збитків промислового свиñarства, одним з найбільш поширених і збиткових є цирковірусна інфекція свиней (ЦВІС) [1, 2]. Це інфекційна хвороба домашніх і диких свиней різних статевовікових груп, що спричинюється цирковірусом II типу (ЦВС-II) і характеризується системним ураженням лімфоїдних тканин, супроводжується глибокою імуносупресією та клінічно проявляється морфо-функціональними розладами різних систем та органів [2, 3]. Діагностика ЦВІС ускладнюється відсутністю цитопатогенної дії цирковірусів та серопозитивністю навіть у клінічно здорових тварин [4, 5].

Тому, серед існуючих методів детекції ЦВС-II найбільш придатними для встановлення діагнозу на ЦВІС є молекулярно-генетичні методи, зокрема різні модифікації полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та встановлення нуклеотидної послідовності збудника методом секвенування [6].

В Україні для детекції ЦВС-II також застосовують молекулярно-генетичні методи — класичну ПЛР і ПЛР у реальному часі [7, 8]. Проте, ці методи мають деякі обмеження, такі як використання термічних циклів для ампліфікації (30–40 циклів), використання коштовного обладнання та брак часу в умовах необхідності швидкої постановки діагнозу [9]. 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. Тому пріоритетним

напрямом у галузі діагностики є розробка експрес-методів, особливо коли перевага в часі є головним вирішальним критерієм під час постановки діагнозу, у тому числі і на ЦВІС.

Попередньо нами було розроблено метод ізотермічної ампліфікації для швидкої детекції генетичного матеріалу ЦВІС-II у клінічних зразках. Цей метод дозволяє швидко генерувати велику кількість копій цільового фрагмента за низької кількості матриці у досліджуваному зразку та відсутності спецустаткування у вигляді термоциклерів. Напрацювання ПЛР-продукту методом LAMP можна було отримати за температур у діапазоні 58–63 °С протягом 45–60 хв, а облік результатів провести шляхом візуалізації рівня флуоресценції зразків після додавання інтеркалюючого барвника до реакційної суміші та опромінення в ультрафіолетовому світлі на транслюмінаторі [10].

Метою даної роботи було провести адаптацію розробленого нами методу детекції генетичного матеріалу ЦВІС-II для використання у польових умовах за відсутності лабораторного обладнання та належних умов роботи.

Матеріали та методи. Для відпрацювання методики було використано зразок печінки від свині, який раніше був нами охарактеризований як позитивний щодо наявності генетичного матеріалу ЦВІС-II.

Екстракцію нуклеїнової кислоти проводили з використанням експрес-методу власної модифікації [11].

Реакцію ізотермічної ампліфікації проводили за допомогою реагентів виробництва фірми Thermo Fisher Scientific (Німеччина) та BioLabs (Великобританія) у відповідності до рекомендацій виробників цих наборів з використанням системи праймерів PCV-F3, PCV-B3, PCV-FIP, PCV-BIP [10]. Для проведення ізотермічної ампліфікації використовували водяну баню WB-4MS (Biosan, Латвія) та термкружку ємністю 380 мл (ZIZ, Україна).

Для ліофілізації реакційної суміші використовували ліофільну сушку ALPHA 1-2 LD plus виробництва Christ (Німеччина). Режим ліофілізації: температура — мінус 61 °С, тиск — 0,035 атм., час ліофілізації — 2 год.

Температуру реакції відслідковували за допомогою термометру ТТЖ-М (ПрАТ «Склоприлад», Україна), реєстрацію температури проводили за допомогою логгеру SterilDisk (Tecnosoft, Італія).

Для візуалізації та контролю результатів ізотермічної ампліфікації використовували транслюмінатор Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США), інтеркалюючий барвник SYBR Green I (100X) виробництва Invitrogen (США) та портативне джерело ультрафіолетового світла — ліхтарик (YATO, Польща).

Результати досліджень. Проведення молекулярно-генетичних досліджень складається з декількох етапів: екстракція сумарної нуклеїнової кислоти, приготування реакційної суміші та внесення досліджуваних зразків, ампліфікація, візуалізація та облік результатів ампліфікації.

Ми спростили процедуру отримання результатів під час дослідження біологічних зразків щодо наявності генетичного матеріалу ЦВІС-II на усіх етапах.

Зазвичай, для екстракції сумарної нуклеїнової кислоти використовують сорбентний метод, заснований на адсорбції нуклеїнових кислот на діоксиді кремнію, який осаджують центрифугуванням і відмивають розчинами з високим вмістом іонів, та подальшій елюції нуклеїнових кислот у гіпоізотонічний розчин [12]. Але для відмивки сорбенту потрібне спеціальне обладнання, таке як центрифуги та вакуумні відсмоктувачі рідини, що впливає на швидкість і вартість аналізу. Тому екстракцію матеріалу проводили за допомогою розробленого нами експрес-методу, суть якого полягає в тому, що адсорбент (діоксид кремнію) закріплюють на пластиковому шпателі, яким одночасно проводять відбір зразка та сорбцію молекул ДНК шляхом почергового занурення петлі шпателя у серію розчинів для екстракції ДНК.

Для підготовки пластикового шпателя на малих мікробіологічних петлях за допомогою клею на основі ціаноакрилату закріплювали діоксид кремнію (silica). Через 1 хв петлі промивали у бідистильованій воді двічі з метою звільнення петлі від надлишку діоксиду кремнію.

У пробірки типу «епендорф» окремо вносили по 300 мкл лізуючого розчину, 300 мкл розчину для відмивання (сольовий буфер), 200 мкл води, вільної від нуклеаз.

Мікробіологічну петлю з діоксидом кремнію занурювали у біологічний матеріал (сироватка крові) та вносили у пробірку з лізуючим розчином. Інкубували протягом 5 хв за кімнатної температури, періодично перемішуючи ручкою петлі. Після інкубації мікробіологічну петлю

виймали та занурювали у пробірку з розчином для відмивання (сольовий буфер). Перемішуючи ручкою шпателя, інкубували протягом 5 хв за кімнатної температури. Для елюювання ДНК мікробіологічну петлю занурювали у пробірку з буфером для елюювання, інкубували протягом 10 хв періодично перемішуючи. Після цього петлю виймали з пробірки, а одержаний розчин нуклеїнових кислот використовували для молекулярно-генетичного аналізу.

Реакційна суміш була приготовлена відповідно до розробленого нами протоколу ампліфікації та ліофілізована.

Для проведення ампліфікації у ліофілізовану суміш додавали 24 мкл води, вільної від нуклеаз, та 1 мкл досліджуваного зразка ДНК.

Як альтернативу водяній бані (устаткування, необхідне для проведення ізотермічної ПЛР) використовували термोकругу ємністю 380 мл.

Для проведення реакції воду нагрівали до 100 °С та наливали у термोकругу. Температуру води у термोकругу контролювали за допомогою термометра. Початком експерименту вважали температуру води 65 °С. Пробірку з реакційної сумішшю закріплювали у вертикальному положенні на шматочку пінопласту для того, щоб пробірка знаходилась на поверхні води. Над верхнім шаром води з харчової фольги створювали додаткову термоізоляцію. Після чого щільно закривали термोकругу та залишали для інкубації протягом 1 год.

Зміну температури води у термोकругу відслідковували за допомогою реєстратора температури — температурного логгера.

На початку ампліфікації температура у верхньому шарі води в термोकругу складала 63,51 °С, наприкінці — 50 °С. Зчитування показників температури за допомогою логгера проходило щохвилини протягом 60 хв. За показаннями логгера зниження температури на початку ампліфікації складало 0,3 °С/хв та 0,2 °С/хв наприкінці ампліфікації у діапазоні температур 51–50 °С.

Як видно з графіку (рис. 1), температура води у термोकругу знижувалась поступово та рівномірно протягом 53 хв, що дозволило забезпечити відповідні умови роботи ферменту.

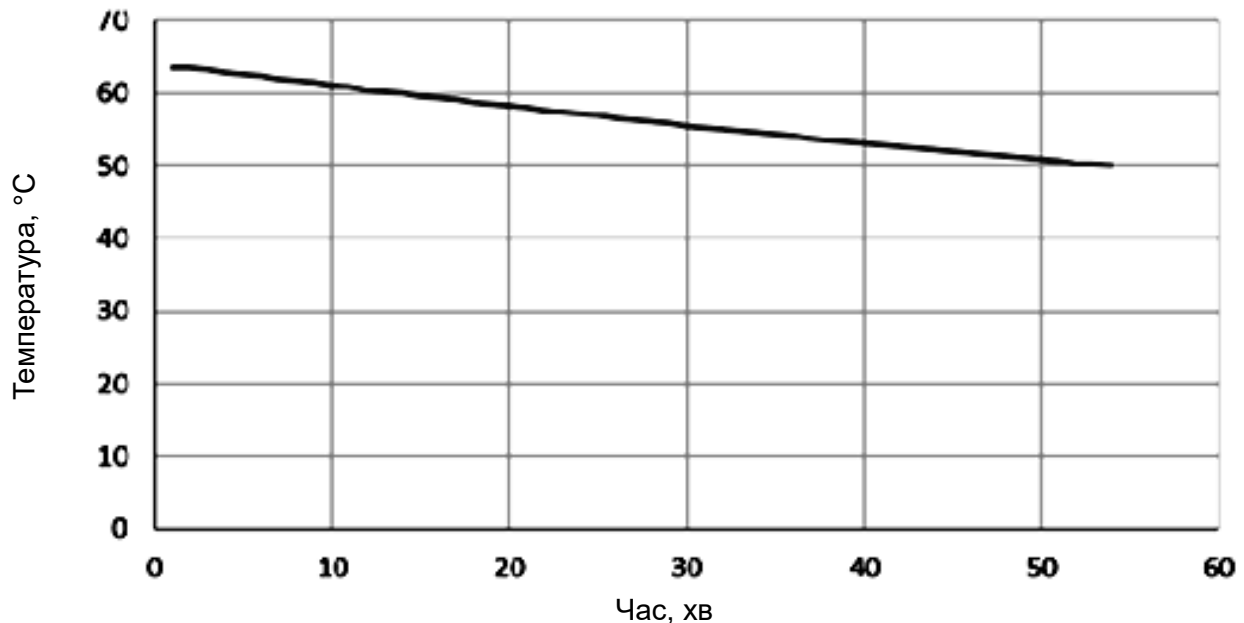


Рис. 1. Температурний графік реакції.

Після ампліфікації проводили візуалізацію результатів дослідження шляхом електрофоретичного аналізу в 1,5 %-му агарозному гелі. За результатами проведених досліджень було встановлено, що ізотермічна реакція відбувалась в обох пробірках — як на водяній бані, так і в термोकругу, про що свідчила поява на електрофореграмі характерних шлейфів, пов'язаних з напрацюванням ампліконів.

Розроблена нами методика була відтворюваною за триразового дослідження.

З метою адаптації розробленого методу для застосування у польових умовах також було спрощено технічно візуалізацію результатів досліджень.

Відсутність випадіння осаду пірофосфату магнію під час проведення ізотермічної ПЛР за стандартним протоколом, що спростило б візуалізацію результатів дослідження без використання транслюмінатора, спонукало нас винайти інший спосіб візуалізації.

У проаналізованих нами літературних джерелах були свідчення щодо застосування бромістого етидію або інтеркалюючого барвника SYBR Green I для візуалізації напрацювання ДНК за використання транслюмінатора. Проте не було даних щодо кількості барвника SYBR Green I або його концентрації. Нами було проведено дослідження з визначення кількості інтеркалюючого барвника та його концентрації, що дало б змогу безперешкодно спостерігати флуоресценцію у досліджуваних зразках за наявності ДНК після проведення ізотермічної ампліфікації. З метою визначення оптимального вмісту барвника SYBR Green I була сформована панель однакових позитивних зразків ДНК та зразків гетерологічних матриць, негативних щодо наявності ЦВС-II. В якості негативного контролю використовували бідистильовану воду. До позитивних зразків додавали 1X, 2X, 5X, 10X, 20X та 40X розчин барвнику SYBR Green I. Для візуалізації ми використовували портативне джерело ультрафіолетового випромінювання (ліхтарик для детекції біологічного матеріалу) на 51 світлодіод з поглинанням за довжини хвилі 395 нм.

Як видно на рис. 2, флуоресценцію можна було спостерігати за додавання до позитивного зразка 5X, 10X, 20X та 40X розчинів барвнику SYBR Green I з подальшим його опромінюванням за використання портативного джерела ультрафіолетового світла. Також було встановлено, що додавання інтеркалюючого барвника у такій кількості забезпечує тимчасову флуоресценцію позитивного зразка після опромінювання, що було видно неозброєним оком за умов денного світла.

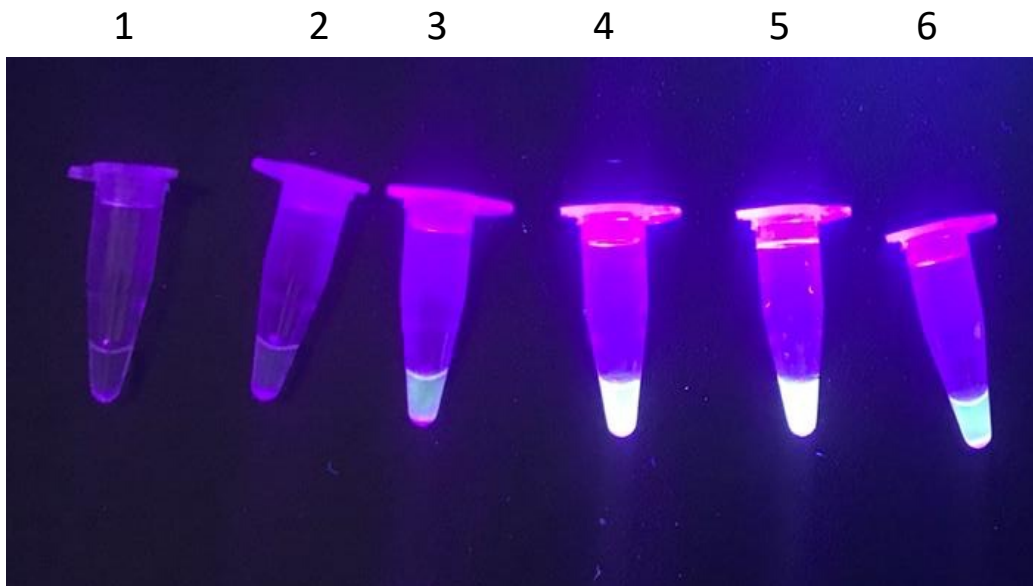


Рис. 2. Результати візуалізації продуктів ампліфікації шляхом детекції флуоресценції у УФ-світлі за допомогою портативного джерела ультрафіолетового випромінювання (довжина хвилі 395 нм). Позитивний щодо ДНК ЦВС-II зразок за додавання розчину барвнику SYBR Green I: 1 — 1X, 2 — 2X, 3 — 5X, 4 — 10X, 5 — 20X, 6 — 40X.

У зразках, що не містили напрацьованого продукту ампліфікації, та у негативному контролі за додавання 20X розчину інтеркалюючого барвника SYBR Green I флуоресценція не спостерігалась.

Висновки. Таким чином, нами було проведено адаптацію розробленого раніше методу ізотермічної ампліфікації для використання в польових умовах, що робить його придатним для застосування за відсутності будь-якого лабораторного спецустаткування. Розроблена на прикладі ідентифікації ЦВС-II методика ізотермічної ампліфікації є спрощеною технічно, не потребує використання спеціального лабораторного обладнання (центрифуги, ампліфікатора або транслюмінатора).

Перспективи використання отриманих результатів. Розроблена експрес-методика детекції генетичного матеріалу ЦВС-II може бути використана як сучасний інструмент молекулярно-генетичної діагностики в польових умовах за відсутності оснащеної лабораторії та належних умов роботи.

Список літератури

1. Opriessnig T., Karuppanan A. K., Castro A. M. M. G., Xiao C. T. Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges. *Virus Research*. 2020. Vol. 286. P. 198044. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198044>.
2. VanderWaal K., Deen J. Global trends in infectious diseases of swine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. Vol. 115, iss. 45. P. 11495–11500. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1806068115>.
3. Герілович А. П. Експериментальне і теоретичне обґрунтування та розробка засобів епізоотологічного моніторингу, діагностики вірусних хвороб тварин та молекулярно-генетичного типування їх збудників (ортоміксо-, параміксо-, герпес-, цирко- та пестивірусна інфекції): дис. ... д-ра вет. наук. Харків: ННЦ «ІЕКВМ», 2011. 440 с. URL: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0511U000408>.
4. Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: A review of aetiology, diagnosis and pathology. *Veterinary Journal*. 2004. Vol. 168, iss. 1. P. 41–49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.09.018>.
5. Harding J. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Veterinary Microbiology*. 2004. Vol. 98, iss. 2. P. 131–135. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.10.013>.
6. Segalés J., Allan G. M., Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews*. 2005. Vol. 6, iss. 2. P. 119–142. DOI: <https://doi.org/10.1079/AHR2005106>.
7. Герілович А. П., Стегний Б. Т. Разработка системы индикации и дифференциации цирковирусов свиней методом полимеразной цепной реакции. *Молекулярная диагностика — 2007*: сб. тр. 6-й Всерос. науч.-практ. конф. (Москва, 28–30 ноября 2007 г.). Москва, 2007. Т. 2. С. 14–15.
8. Ситюк М. П., Музикіна Л. М., Галка І. В., Нічик С. А., Спиридонов В. Г., Мельничук С. Д. Розробка та валідація методики полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для детекції ДНК цирковирусу свиней другого типу. *Ветеринарна біотехнологія*: бюл. 2014. Вип. 25. С. 101–107. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/vbtb_2014_25_31.
9. Allan G. M., Ellis J. A. Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2000. Vol. 12, iss. 1. P. 3–14. DOI: <https://doi.org/10.1177/104063870001200102>.
10. Рудова Н. Г., Солодянкін О. С., Герілович А. П. Детекція генетичного матеріалу цирковирусу свиней II типу методом петлевої ізотермальної ампліфікації (LAMP). *Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб.* 2019. Вип. 105. С. 20–25. DOI: <https://doi.org/10.36016/VM-2019-105-4>.
11. Gerilovych A., Rekotchuk M., Konstantynovska O., Rudova N., Hrek I., Poteiko P., Solodiantkin O. Development of the improved express method of DNA extraction. *Fourth Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium (Kyiv, Ukraine, 20–24 May 2019)*: abstr. Kyiv, 2019. P. 414.
12. Boom R., Sol C. J., Salimans M. M., Jansen C. L., Wertheim-van Dillen P. M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990. Vol. 28, iss. 3. P. 495–503. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>.

EXPRESS METHOD FOR DETECTION OF GENETIC MATERIAL OF PCV-II IN FIELD CONDITIONS

**Rudova N. G., Isakov M. M., Lymanska O. Yu.,
Bolotin V. I., Solodiantkin O. S., Gerilovych A. P.**

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

The purpose of this work was to adapt the method for detection of genetic material of PCV-II developed by us for use in the field conditions in the absence of laboratory equipment and proper working conditions. To develop the technique, a liver sample from a pig was used, which was characterized as positive for the presence of PCV-II genetic material. Nucleic acid extraction was performed using an express method of our own modification. The isothermal amplification reaction was carried out using reagents manufactured by Thermo Fisher Scientific (Germany) and BioLabs (Great Britain) following the manufacturers' recommendations when using the PCV-F3, PCV-B3, PCV-FIP, PCV-BIP primer systems. A WB-4MS water bath (Biosan, Latvia) and a 380 ml thermal mug (ZIZ, Ukraine) were used for isothermal amplification. Freeze dryer ALPHA 1-2 LD plus manufactured by Christ (Germany) was used for lyophilization of the reaction mixture. The reaction temperature was monitored using a TTK-M thermometer (PJSC "Skloprylad", Ukraine), the temperature was recorded using a SterilDisk logger (Tecnosoft, Italy). Gel Doc XR+ transilluminator (Bio-Rad, USA), SYBR Green I intercalating dye produced by Invitrogen (USA) and portable ultraviolet light source (YATO, Poland) were used to visualize and control the results of isothermal amplification. The previously developed isothermal amplification method was adapted for use in field conditions on the example of the identification of PCV-II. The developed method of isothermal amplification is technically simplified and does not require the use of special laboratory equipment

Key words: DNA, PCR, thermal mug, UV flashlight