

5. БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 619:616.98-078:578.825:577.2.08:636.4

DOI 10.36016/VM-2022-108-12

РОЗРОБЛЕННЯ ПОЗИТИВНОГО РЕКОМБІНАНТНОГО КОНТРОЛЮ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ВІРУСУ ХВОРОБИ АУЄСКИ ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛР

Рудова Н. Г., Лиманська О. Ю., Бузун А. І. Солодянкін О. С.

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

Метою роботи було конструювання позитивного рекомбінантного контрольного зразка для детекції вірусу хвороби Ауєскі шляхом ПЛР. Конструювання рекомбінантного позитивного контролю проводили спочатку віртуально у режимі онлайн за допомогою програми SnapGene Software, а потім *in vitro* з використанням плазмідного вектору рTZ57R/T, що входить до складу комерційного набору для ТА-клонування «InstAclone PCR Cloning Kit» (Fermentas, Латвія). Як вставку було використано фрагмент гена, що кодує глікопротеїн E вірусу хвороби Ауєскі довжиною 235 п.н., отриманий методом класичної ПЛР з використанням системи праймерів AuDV_gE1_F/R. Отриманий амплікон був очищений та лігійований до плазмідного вектору рTZ57R/T, а сконструйовану плазмідну молекулу було інтегровано до культури компетентних клітин *E. coli* штаму DH5α. Після проведення трансформації було обрано 10 білих поодиноких колоній *E. coli* за маркером селективних ознак, 5 з яких було культивовано у рідкому поживному середовищі з метою отримання бактеріальної біомаси *E. coli*. Напрацьовану бактеріальну масу використовували для екстракції плазміди. Проведенням електрофоретичного аналізу у 1,5 %-му агарозному гелі та визначення концентрації ДНК було підтверджено позитивний результат нашої роботи. Розроблений нами ампіцилін-резистентний клон *E. coli* DH5α, трансформований сконструйованою плазмідною рTZ57R/T_AuDV зі вставкою фрагмента що кодує глікопротеїн E вірусу хвороби Ауєскі, довжиною 235 п. н. Він може бути використаний як позитивний контрольний зразок для детекції генетичного матеріалу вірусу хвороби Ауєскі шляхом ПЛР

Ключові слова: рTZ57R/T, AuDV_gE1_F/R, плазміда

Вступ. Вірус хвороби Ауєскі (ВХА) належить до родини Herpesviridae, підродини Alphaherpesvirinae, роду *Alphaherpesvirus* [1]. Представники сімейства Suidae (справжні свині) є єдиними природними хазяями ВХА, хоча вірус може уражати багатьох інших ссавців, включаючи жуйних, м'ясоїдних і гризунів. Дикі кабани можуть виступати як резервуари і становити потенційну загрозу для домашніх тварин, у тому числі собак [2, 3].

У складі ВХА ідентифіковано 17 глікопротеїнів, два з яких — глікопротеїн gE і глікопротеїн gI — відповідають за реплікацію вірусу та його вірулентність. За відсутності у структурі ВХА гена, що кодує глікопротеїн gE, спостерігається різке зниження нейровірулентності цього вірусу для свиней, однак його здатність до розповсюдження нервовими клітинами зберігається [4].

Хворобу Ауєскі реєструють у багатьох країнах світу, зокрема у всіх європейських країнах, а також країнах Південної і Північної Америки, Африки та Азії [3, 5].

Незважаючи на величезний прогрес, досягнутий у світі щодо боротьби та ліквідації ВХА у домашніх свиней, існує все більше доказів того, що цей інфекційний агент є більш поширеним серед поголів'я домашніх та диких свиней у всьому світі, ніж вважалось спочатку [5, 6].

Для детекції вірусу хвороби Ауєскі застосовують вірусологічні, серологічні та молекулярно-генетичні методи, у тому числі ПЛР та ПЛР у реальному часі [7]. При цьому застосування позитивного контролю є запорукою високої якості досліджень та достовірності результатів, що будуть отримані. Використання як контролю вірусвміщуючого матеріалу ускладнюється необхідністю його періодичного отримання та обмеженим терміном зберігання. Крім того, це потребує особливих умов при роботі з таким матеріалом, що пов'язано з потенційними ризиками для біобезпеки при проведенні дослідження [8–11]. Використання рекомбінантних зразків як позитивного контролю має переваги внаслідок тривалого терміну зберігання такої

конструкції, високої копійності, можливості відновлення шляхом клонування [12]. Застосування плазмід, що містить фрагмент певної геномної ДНК, набуло широкого застосування при виявленні збудників інфекційних захворювань тварин [13 14] та людини [15].

Тому метою даної роботи було конструювання позитивного рекомбінантного контролю для детекції вірусу хвороби Ауескі методом ПЛР.

Матеріали і методи. Віртуальне конструювання рекомбінантного позитивного контролю проводили у режимі онлайн за допомогою програми SnapGene Software (Insightful Science, snapgene.com).

Для створення плазмідного контролю *in vitro* використовували плазмідний вектор pTZ57R/T, що входить до складу комерційного набору для ТА-клонування «InstAclone PCR Cloning Kit» виробництва «Fermentas» (Латвія). Як вставку було використано фрагмент гена, що кодує глікопротеїн Е вірусу хвороби Ауескі довжиною 235 п.н., отриманий за допомогою стандартної ПЛР з використанням комерційного набору «Maxima Hot Start Green PCR Master Mix» виробництва «Thermo Scientific» (Литва) та системи праймерів AuDV_gE1_F (5'-TCGGCCCTCGCCTCCCTGA-3'); AuDV_gE1_R (5'-TGCCCATCTCCGGGGCCTC-3') [7].

Інтеграцію плазмід до культури компетентних клітин *E. coli* штаму DH5a було здійснено методом хімічної поразки (параметри, ссылка), з наступним висівом на LB-середовище («Sigma-Aldrich», США) з додаванням 100 мкг/мл ампіциліну в кінцевій концентрації.

Для екстракції плазмід використовували комерційний набір «Plasmid Miniprep Kit» виробництва «GeneJET» (Литва).

Визначення концентрації ДНК та оцінювання якості ДНК проводили на спектрофотометрі «NanoDrop» («DeNovix», США) при довжині хвилі 260 та 280 нм.

Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації проводили шляхом горизонтального електрофорезу (камера для горизонтального електрофорезу фірми «BioRad» (США) у 1,5 %-му агарозному гелі за напруженості електричного поля 10 В/см.

Для проведення електрофоретичного аналізу використовували агарозу («Biozym», Німеччина), бромід етидію («Sigma-Aldrich», США), маркери молекулярної маси з дискретністю 100 п. н. («Invitrogen», США; «Promega», США та «Fermentas Gene ruler», Латвія)

Результати досліджень. З метою отримання позитивного рекомбінантного контрольного зразка для детекції генетичного матеріалу вірусу хвороби Ауескі шляхом ПЛР нами було сконструйовано віртуальну модель векторної молекули на основі плазміді рTZ57R/T з вбудованим до її складу фрагментом гена, що кодує глікопротеїн Е вірусу хвороби Ауескі довжиною 235 п. н. Загальна довжина теоретично змодельованої плазмідної молекули становила 3 122 п. н. (рис. 1).

Для створення плазмідного контролю *in vitro* на першому етапі роботи було напрацьовано фрагмент гена, що кодує глікопротеїн Е вірусу хвороби Ауескі, довжиною 235 п. н. Для цього ми використали зразок ДНК, отриманий з гомогенату селезінки від свині, який раніше був нами охарактеризований як позитивний щодо наявності генетичного матеріалу ВХА. Проведенням електрофоретичного аналізу шляхом горизонтального гель-електрофорезу було підтверджено наявність амплікону необхідної довжини — 235 п. н.

Отриманий амплікон був очищений та лігійований до плазмідного вектору рTZ57R/T, який використано для трансформації компетентних клітин *E. coli* DH5a.

Оскільки у складі зазначеного вектору містився ген стійкості до ампіциліну, то при подальшому клонуванні у культурі *E. coli* штаму DH5a він виступав маркером селективних ознак. Тому після проведення трансформації було обрано 10 білих поодиноких колоній *E. coli* з ознаками набутої резистентності до ампіциліну.

Скринінг обраних колоній за допомогою ПЛР показав наявність специфічної вставки довжиною 235 п. н. у кожній з них.

Для культивування у рідкому поживному середовищі було обрано п'ять колоній *E. coli*. Після цього отриману бактеріальну біомасу використовували для екстракції плазмід. Наявність фрагментів довжиною приблизно 3 тис. п. н. при проведенні електрофоретичного аналізу у 1,5 %-му агарозному гелі отриманих зразків свідчило про позитивний результат роботи.

Концентрація ДНК у першому зразку склала 112,15 нг/мкл, у другому — 152,46 нг/мкл, у третьому — 99,98 нг/мкл, четвертому та п'ятому — 187,22 нг/мкл та 171, 67 нг/мкл відповідно.

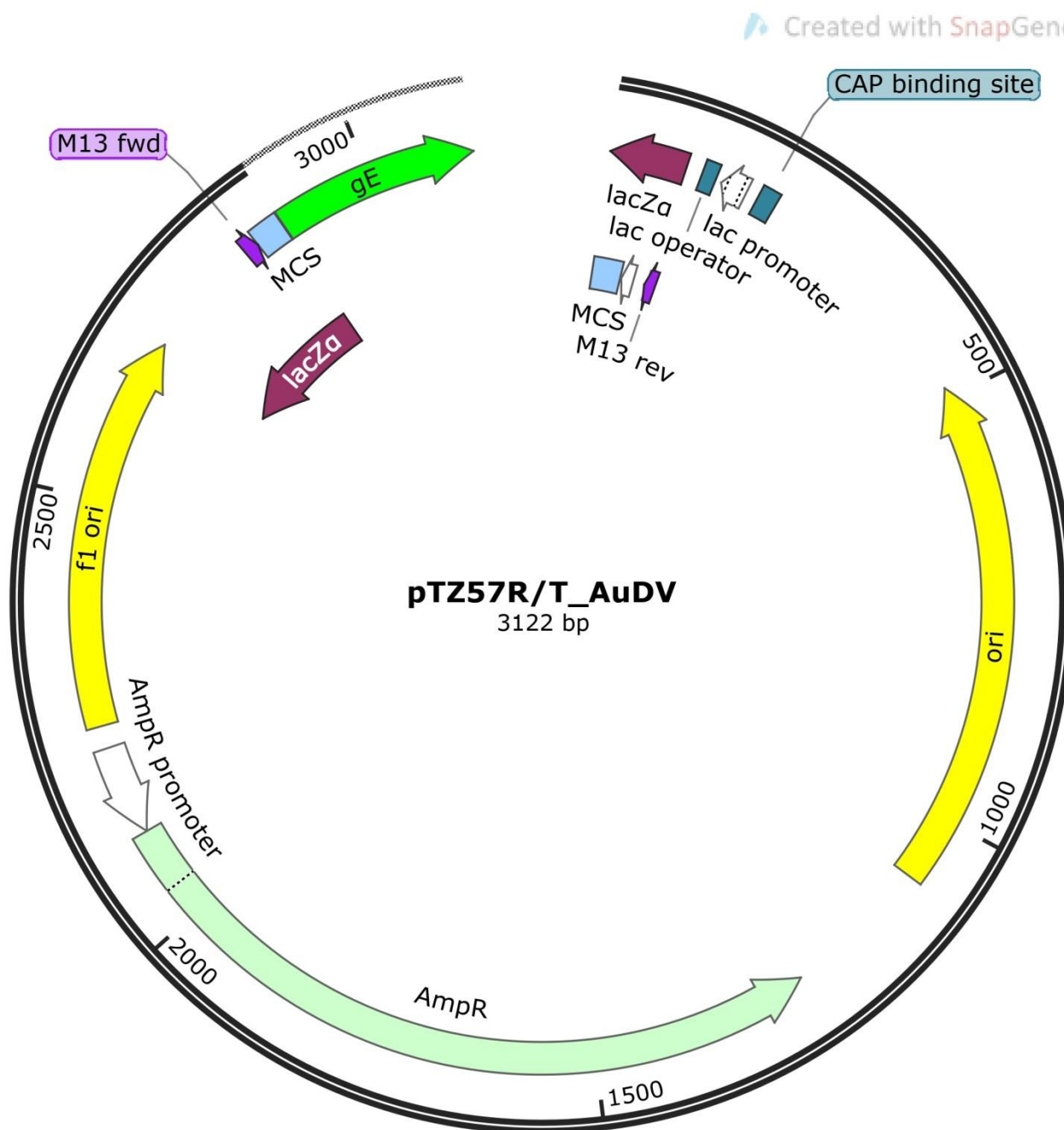


Рис. 1. Схема плазмідного вектору pTZ57R/T_AuDV.

Зразок, що мав найбільшу концентрацію плазміди, тобто 187,22 нг/мкл, був обраний для подальших досліджень в якості позитивного рекомбінантного контролю.

Висновки. Таким чином, було отримано ампіцилін-резистентний клон *E. coli* DH5α, який трансформовано сконструйованою плазмідною pTZ57R/T_AuDV зі вставкою гена, що кодує глікопротеїн E вірусу хвороби Ауескі, довжиною 235 п. н. Він може бути використаний як позитивний контрольний зразок для детекції генетичного матеріалу вірусу хвороби Ауескі за допомогою ПЛР.

Перспективи використання отриманих результатів. Розроблений позитивний рекомбінантний зразок може бути використано у лабораторній діагностиці хвороби Ауескі при проведенні молекулярно-генетичних досліджень біологічного матеріалу за допомогою ПЛР.

Список літератури

1. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / editors A. M. Q. King et al.; International Committee on Taxonomy of Viruses. Oxford : Elsevier, 2011. 1326 p.
2. Moreno A. et al. Detection and molecular analysis of Pseudorabies virus strains isolated from dogs and a wild boar in Italy. *Veterinary microbiology*. 2015. Vol. 177, No 3-4. P. 359–365. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.04.001>.
3. Diseases of swine / ed. J. J. Zimmerman. Chichester, West Sussex : Wiley-Blackwell, 2012. 983 p.
4. Pomeranz L. E., Reynolds A. E., Hengartner C. J. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2005. Vol. 69, No 3. P. 462–500. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.3.462-500.2005>.
5. Müller T. et al. Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective. *Archives of virology*. 2011. Vol. 156, No 10. P. 1691–1705. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1080-2>.
6. Verpoest S., Cay A. B., De Regge N. Molecular characterization of Belgian pseudorabies virus isolates from domestic swine and wild boar. *Veterinary microbiology*. 2014. Vol. 172, No 1-2. P. 72–77. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.001>.
7. Герілович А. П. та ін. Молекулярно-генетичні методи діагностики у ветеринарній медицині та біотехнології : навчальний посібник / під заг. ред. д-ра вет. наук, проф., акад. НААН України та РАН Б. Т. Стегнія та д-ра вет. наук, ст. наук співробітника А. П. Геріловича ; Нац. акад. аграр. наук України, Нац. наук. центр "Ін-т експерим. і клініч. вет. медицини". Київ : СТ-Друк, 2014. 285 с.
8. Chan M., Jiang B., Tan T. Y. Using Pooled Recombinant Plasmids as Control Materials for Diagnostic Real-Time PCR. *Clinical laboratory*. 2016. Vol. 62, No 10. P. 1893–1901. DOI: <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2016.160114>.
9. Caasi D. R. et al. A multi-target, non-infectious and clonable artificial positive control for routine PCR-based assays. *Journal of microbiological methods*. 2013. Vol. 95, No 2. P. 229–234. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.017>.
10. Chen J. M. et al. A stable and differentiable RNA positive control for reverse transcription-polymerase chain reaction. *Biotechnology letters*. 2006. Vol. 28, No 22. P. 1787–1792. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9161-0>.
11. Lion T. Current recommendations for positive controls in RT-PCR assays. *Leukemia*. 2001. Vol. 15, No 7. P. 1033–1037. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402133>.
12. Matange K., Tuck J. M., Keung A. J. DNA stability: a central design consideration for DNA data storage systems. *Nature communications*. 2021. Vol. 12, No 1. P. 1358. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21587-5>.
13. Das A. et al. Development and validation of a highly sensitive real-time PCR assay for rapid detection of parapoxviruses. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 2017. Vol. 29, No 4. P. 499–507. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638716680676>.
14. Yao M. et al. Development and application of multiplex PCR method for simultaneous detection of seven viruses in ducks. *BMC veterinary research*. 2019. Vol. 15, No 1. P. 103. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1820-1>.
15. Camacho D. et al. Clonación de secuencias de alfavirus y flavivirus para su uso como controles positivos en el diagnóstico molecular [Cloning alphavirus and flavivirus sequences for use as positive controls in molecular diagnostics]. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*. 2016. Vol. 33, No 2. P. 269–273. DOI: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.332.2101>.

**DEVELOPMENT OF A POSITIVE RECOMBINANT CONTROL FOR
THE DETECTION OF THE AUJESZKY'S DISEASE VIRUS USING PCR**

Rudova N. H., Lymanska O. Yu., Buzun A. I. Solodianskin O. S.

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

The work aimed to construct a positive recombinant control sample for the detection of Aujeszky's disease virus by PCR. The construction of the recombinant positive control was first performed virtually online using the SnapGene software program, and then in vitro using the plasmid vector pTZ57R/T, which is included in the commercial kit for TA cloning "InstAclone PCR Cloning Kit" (Fermentas, Latvia). As an insert, a 235-bp long fragment of the gene encoding the glycoprotein E of the Aujeszky's disease virus, obtained by the classical PCR method using the AuDV_gE1_F/R primer system, was used. The resulting amplicon was purified and ligated to the plasmid vector pTZ57R/T, and the constructed plasmid molecule was integrated into the culture of competent cells of *E. coli* strain DH5a. After the transformation, 10 white single colonies of *E. coli* were selected according to the marker of selective traits, 5 of which were cultivated in a liquid nutrient medium in order to obtain bacterial biomass of *E. coli*. The developed bacterial mass was used for plasmid extraction. The positive result of our work was confirmed by electrophoretic analysis in 1.5% agarose gel and determination of DNA concentration. The ampicillin-resistant clone of *E. coli* DN5a developed by us, transformed with the constructed plasmid pTZ57R/T_AuDV with the insertion of a fragment encoding the glycoprotein E of Aujeszky's disease virus, 235 bp in length. It can be used as a positive control sample for the detection of the genetic material of Aujeszky's disease virus by PCR

Keywords: pTZ57R/T, AuDV_gE1_F/R, plasmid