

ОПТИМИЗАЦИЯ ПЦР-ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ЭКСПЕРЕСС ДИАГНОСТИКИ АДЕНОВИРУСОВ РЕСПИРАТОРНЫХ ГРУПП

Штыров А.А., Орлова С.В.

*ГУ РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Республика
Беларусь*

Резюме. Разработаны праймеры и гибридизационные зонды для индикации аденовируса человека методом ПЦР с внутренним контролем в реальном времени с гибридизационно-флюоресцентной детекцией. Экспериментально показано, что праймеры внутреннего контроля (GAPDH4 и B2G) работают в одинаковых условиях совместно с аденовирусными

праймерами. Данные праймеры и зонды могут быть использованы в качестве основы создания набора для экспресс-индикации аденовируса в материале от пациентов.

Ключевые слова: аденовирус, полимеразная цепная реакция, внутренний контроль.

Summary: We designed primers and probes for indication human adenovirus in RT-PCR with internal control. It was shown that the primers of internal control (GAPDH4 and B2G) operate together with adenovirus primers under the same conditions. These primers and probes may be used as the basis of a kit for rapid detection for indication human adenovirus in material patients.

Keywords: human adenovirus, polymerase chain reaction, internal control.

Введение. В эпидемиологическом надзоре за вирусами, вызывающие острые респираторные заболевания (ОРВИ), используют серологические методы, чаще всего метод флуоресцирующих антител (МФА). Метод позволяют проводить массовый скрининг проб за короткое время [1]. Эффективность такого метода напрямую зависит от аналитической чувствительности используемых антител, полученных при производстве, и подготовки анализируемого материала (назофарингеальный смыв (НФС)) [2]. Кроме того, неправильный забор смыва может приводить к ложноотрицательным результатам. Для правильной интерпретации результата необходимо вводить контроль, который бы обеспечивал надежность результата. Методически постановка МФА не всегда обязывает введения контроля. Поэтому необходимым условием при выборе подходящего метода исследования НФС является высокая чувствительность, специфичность и надежность результатов. Указанным требованиям полностью соответствуют методы ПЦР-анализа. Поэтому совершенствование и оптимизация ПЦР-технологий для выявления респираторных патогенов является актуальным и перспективным направлением исследования, обеспечивающим повышение достоверности и качества лабораторного контроля эпидемических служб.

Среди всего разнообразия ОРВИ возбудителей (их более 200) аденовирусы человека выявляются с частотой от 7,6 % до 41,6 %. Поэтому аденовирусы занимают особое место как этиологический агент заболевания ОРВИ среди населения, особенно среди детей [1, 3, 4].

Цель исследования состояла в разработке набора праймеров и зондов для ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов в реальном времени для индикации аденовируса человека респираторных видов в НФС с внутренним контролем.

Материалы и методы. В качестве модельного объекта аденовируса человека был использован аденовирус человека 3 серотипа (депонент № 110

в коллекции патогенных микроорганизмов РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Для внутреннего контроля использовали культуру клеток Нер-2С (пр-во ГУ РНПЦ эпидемиологии и микробиологии).

Выделение ДНК из проб проводили с помощью набора «Рибо-сорб» и «Рибо-преп» производство «Амплиценс» (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкциями производителя.

Аmplification выделенной ДНК осуществляли с использованием реактивов фирмы «ПраймТех» (РБ) на приборе Rotor-Gene (Corbett Research, Австралия) и iCycler (Bio-Rad, США).

Результаты и обсуждение. Как известно аденовирусы человека (HAdV) относятся к роду *Mastadenovirus*, где выделяют семь видов (Human Adenovirus A-G). Сейчас насчитывают 56 типов HAdV, где из них только серотипы трех видов (HAdV-B, HAdV-C, HAdV-E) вызывают клинические проявления ОРВИ, а вид HAdV-D имеет смешанную симптоматику заболевания желудочно-кишечного тракта и выделяется крайне редко в эпителии дыхательных путей. Хотя серотипы данных видов HAdV и относятся к одному роду, но их количество существенно затрудняет их индикацию в молекулярно-генетическом методе. Для данных представителей серотипа степень гомологии генетического материала внутри вида составляет 80-95 %, а между видами – до 20 %. Поэтому на первом этапе необходимо было определить области с высокой степенью консервативности в пределах между видами для того, чтобы служить мишенью для амплификации. Для этого были построены полногеномные выравнивания и определены участки с высокой степенью консервативности, внутри которых и осуществлялся поиск праймеров.

В результате выравнивания 19 полногеномных нуклеотидных последовательностей аденовируса человека, принадлежащих к четырем видам (HAdV-B - HAdV-E) установлено, что достаточной степенью консервативностью для поиска праймеров и зондов для ПЦР обладает область фрагмента генома, кодирующая мономер гексона (23 341-25 716). Далее для всех серотипов строили выравнивания L-4 гена (ген мономера гексона) протяженностью 2 800 п.н.. В пределах этого гена был выбран участок протяженностью 1 300 п.н., где максимальная доля нуклеотидных различий между последовательностями составляла до 10 %. В результате автоматического (программами PrimerExpress 3.0 (Applied Biosystems)) и дополнительного ручного поиска было выбрана 17 олигонуклеотидных последовательностей для аденовируса и установлены их основные характеристики. Далее выбранные праймеры сравнивали с нуклеотидными последовательностями серотипов респираторных видов (HAdV-B, HAdV-C, HAdV-E). С целью повышения специфичности праймеров и способности

выявлять большее количество серотипов аденовируса, была выбрана одна пара праймеров и зонд, которую модифицировали путем введения вырожденных оснований.

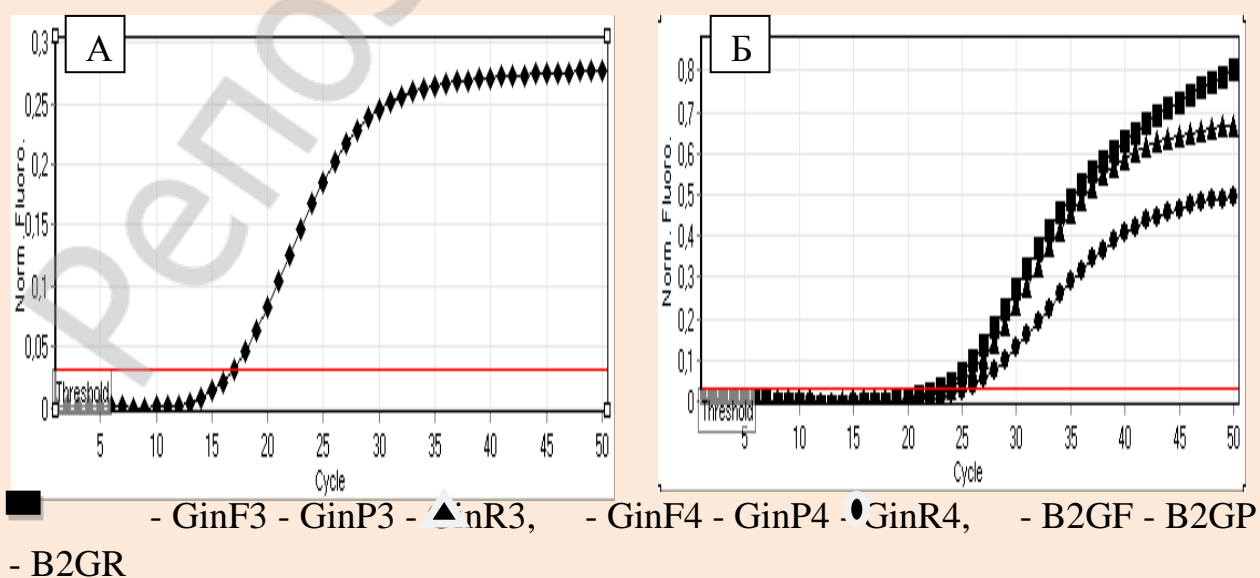
В качестве контроля по доказательству выделения ДНК или качества проведенной ПЦР использовали гены «домашнего хозяйства» (house-keeping genes). Для этого были выбраны гены GAPDH и в-глобулина. К выбранным генам осуществили поиск праймеров с использованием тех же программных средств, что и при подборе аденовирусных праймеров. В результате были выбраны 6 праймеров для гена GAPDH и 3 праймера для гена в-глобулина. Все выбранные праймеры были синтезированы для последующей экспериментальной оценки их свойств и возможного использования для постановки полимеразной цепной реакции (таблица 1).

Таблица 1 - Исследуемые праймеры и зонды

Ген детекции	Праймеры и зонды
HAдV	ADVf - ADVp - ADVr
GAPDH3	GinF3 - GinP3 - GinR3
GAPDH4	GinF4 - GinP4 - GinR4
в-глобулина (B2G)	B2GF - B2GP - B2GR

На втором этапе работа велась в направлении оптимизации условий амплификации с выбранными праймерами для детекции аденовируса с внутренним контролем. Для этого проводили разовую амплификацию праймеров для каждого гена по отдельности (рисунок 1).

Первичную оценку праймеров и зондов осуществляли в следующих условиях: по 1 pmol праймеров, 0,1 pmol зонда, буфер, содержащий 65 mM Трис-НСl, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 0,02 % Твин 20, по 200 мкм ДНТФ, 5 ед. Taq-полимеразы; режим амплификации: 95° — 5', 45 циклов 95° — 10", 60° — 30".



◆ - ADVF - ADVP - ADVR

Рисунок 1 – Кривые флуоресценции при амплификации ДНК аденовируса (А) и культуры клеток Нер-2С (Б)

Далее проводили оптимизацию концентрации ионов магния в ПЦР-смеси. Для этого осуществляли постановку ПЦР с праймерами и зондами на аденовирус и внутренний контроль концентрации ионов магния от 0,5 до 6,0 мМ с шагом в 0,5 мМ. По результатам экспериментов была определена концентрация ионов магния (4,5 мМ), показавшая минимальное значение порогового цикла для аденовирусного гена и два гена внутреннего контроля (GAPDH4 и B2G).

Следует отметить, что выбор праймеров, показавших лучший результат при одинаковой концентрации ионов магния, был обусловлен возможностью дальнейшего совмещения двух систем праймеров и зондов в одной пробирке (мультиплексировании).

Следующий этап был посвящен поиску оптимальной температуры отжига праймеров и зондов при ПЦР. Результаты (таблица 2) показали, что самые низкие значения пороговых циклов реакции достигались при использовании температур отжига равной 60°C. Обе системы праймеров для внутреннего контроля могут быть использованы при постановке ПЦР для выявления аденовируса.

Таблица 2 – Праймеры и зонды для амплификации ДНК аденовируса с внутренним контролем

T _m	Пороговое значение (C _t)			
	НAdV	GAPDH4	НAdV	B2G
56°	19,38	26,16	19,38	26,65
56,7°	19,9	27,13	19,08	27,42
58°	18,15	24,34	18,15	24,92
60°	18,14	25,44	18,14	25,88
62,4°	19,10	26,06	19,10	25,24
64,3°	20,57	25,54	20,57	25,2
65,5°	22,97	22,6	22,97	24,56
66°	23,97	23,03	23,89	24,99

Таким образом, в результате серии экспериментов были определены оптимальные условия амплификации (состав реакционной смеси, режим амплификации) для выявления ДНК аденовируса методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени с внутренним контролем в одной пробирке.

Выводы. В ходе исследований разработаны праймеры и гибридационные зонды для индикации аденовируса методом ПЦР в

реальном времени с гибридационно-флюоресцентной детекцией с внутренним контролем. В результате оценки основных параметров (T_m , GC%, ДG, образование димеров, шпилек и наличие сайтов неспецифического связывания) было выбрано 2 праймера, 1 зонд для аденовируса и 6 праймеров, 3 зонда для внутреннего контроля. Подобраны условия идентификации аденовируса методом ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции: состав реакционной смеси и температурный режим амплификации. Экспериментально показано, что праймеры внутреннего контроля (GAPDH4 и B2G) работают в одинаковых условиях совместно с аденовирусными праймерами. Данные праймеры и зонды могут быть использованы в качестве основы создания набора для экспресс-индикации аденовируса в материалах от пациентов.

Литература

1. Сергеенко, Е.Н. Структура ОРВИ у госпитализированных пациентов [Электронный ресурс] /Е.Н. Сергеенко // Актуальные инфекции детей в 21 веке: респ. обуч. семинар с междунар. участием, Минск, 28 нояб. 2014 г. Режим доступа: <http://www.bsmu.by/downloads/vrachu/konferencii/2014/inf/29.pdf>. - Дата доступа 16.03.2015г..
2. С.В. Орлова [и др.] Информативность различных методов лабораторной диагностики аденовирусной инфекции/С.В. Орлова [и др.] // Здоровоохранение. – 2010. – №12. – С. 47-51.
3. С.В. Орлова [и др.] Этиологическая структура заболеваемости острыми респираторными инфекциями у госпитализированных детей / С.В. Орлова [и др.] // Здоровоохранение. – 2009. – №12. – С. 14-16
4. Сивец, Н.В., Эпидемиологические аспекты бокавирусной инфекции в Республике Беларусь /Н.В. Сивец, Н.В. Грибкова // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр., Минск: ГУ РНМБ, 2013 – вып. 6. -С. 97-99.