

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДИНА**

Лиманська Ольга Юріївна

**УДК 575.22
 579.53
 579.253**

**МОЛЕКУЛЯРНІ ТЕХНОЛОГІЇ В ТИПУВАННІ ТА ДЕТЕКЦІЇ
ПАТОГЕНІВ БАКТЕРІАЛЬНОЇ І ВІРУСНОЇ ПРИРОДИ**

03.00.20 – біотехнологія

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук**

Київ – 2011

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у лабораторії специфічної профілактики краплинних інфекцій ДУ “Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України” (м. Харків).

Науковий

консультант —

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Лиманський Олександр Петрович,
ДУ “Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова
НАМН України”, м. Харків,
головний науковий співробітник.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Пархоменко Юлія Михайлівна,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
провідний науковий співробітник;

доктор фізико-математичних наук, професор
Горбенко Галина Петрівна,
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,
професор кафедри біологічної і медичної фізики;

доктор біологічних наук, професор
Горбатенко Ігор Юрійович,
Інститут південного овочівництва та баштанництва НААН
України, завідувач лабораторії гетерозисної селекції.

Захист відбудеться «___» _____ 2011 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: вул. Леонтовича, 9, Київ-30, 01601.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий _____ 2011 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Кірсенко О.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Сучасний період біологічних досліджень можна охарактеризувати як постгеномну еру: значні зусилля вчених, які працюють в галузі геноміки, направлено на розробку ефективних засобів всебічного аналізу генетичних текстів. Завершення у 2000 р. проекту з секвенування геному людини послужило поштовхом для кардинальних змін в молекулярній біології, і на цей час відповідні міжнародні проекти, направлені на розшифровку структури геному різних організмів, займають особливе місце у вирішенні ряду проблем медичної біотехнології, молекулярної медицини, медичної та ветеринарної мікробіології, епідеміології (Леск А., 2009). Отримані результати сприяють розвитку фундаментальних знань, оскільки передбачають можливість встановлення еволюційних взаємозв'язків мікроорганізмів, ідентифікацію, класифікацію та визначення можливих функцій генів; визначення регуляторних елементів (до яких, зокрема, відносяться неканонічні структури, що утворюються різними варіантами повторів в молекулах ДНК та РНК і є гарячими точками геномної нестабільності) та створення регуляторних карт; виявлення поліморфізмів та аналіз їхнього розподілу тощо (Примроуз С., Тваймен Р., 2008). Крім цього, поява нової генетичної інформації, створення біоінформатичних методів стимулюють удосконалення традиційних та появу новітніх методологій та технологій у харчовій промисловості, фармакології, екології, тваринництві та рослинництві, а також відіграють певну роль у розвитку молекулярної медицини, зокрема розробці методологічних підходів та ефективних методів детекції і диференціації збудників інфекційних захворювань як людини, так і тварин. Для використання величезного масиву даних важливо продовжувати розвинення методології аналізу нуклеїнових кислот, в тому числі пошуку нової інформації, яка закодована не тільки в первинній, а й у вторинній структурі. З іншого боку, дослідження структурних відмінностей геномних ДНК і РНК патогенів та обмеження у застосуванні фенотипових (морфологічних) маркерів для типування збудників інфекційних захворювань стимулювали розробку ДНК-маркерів та розвиток методів гено-типування (Gurtler V. et al., 2001; Сулимова Г., 2004). На цей час до числа найпоширеніших молекулярних маркерів можна віднести послідовності нуклеотидів, що є специфічними сайтами для рестриктаз, IS-елементи та нуклеотидні послідовності, що повторюються, “випадкові” повтори, маркери, створені на основі конформаційних змін одониткової ДНК, пов'язаних з наявністю точкових мутацій. Урізноманітненню ДНК-маркерів, що широко використовують у різних областях біології та медицини, сприяв стрімкий розвиток та удосконалення молекулярно-генетичних технологій на базі модифікацій методу полімеразної ланцюгової реакції – найефективнішого методу детекції та типування патогенів різної природи (Morlan J. et al., 2009; Gustafson K., 2008; Thelwell N. et al., 2000).

Незважаючи на існуючу різноманітність методів ідентифікації та диференціації інфекційних агентів як вірусної, так і бактеріальної природи, проблема швидкої, ефективної та високоспецифічної детекції і типування патогенів залишається актуальною внаслідок появи та реєстрації нових патогенів; необхідності виявлення, локалізації та швидкої ліквідації спалахів інфекційних захворювань та їх наслідків; розповсюдження мультирезистентних штамів мікроорганізмів; ідентифікації вірулентних штамів; необхідності створення національних систем біозахисту стосовно патогенів з біотерористичним потенціалом; здійснення належного контролю вакцинних препаратів тощо (WHO, 2008; WHO, 2009; Kuiken T. et al., 2003). Вирішення вказаних проблем можливе на основі насамперед молекулярно-генетичних (внаслідок відомих певних переваг), а також інформаційних технологій.

Враховуючи зазначене вище, дисертаційна робота присвячена проблемі підвищення ефективності методів молекулярно-генетичної детекції та типування інфекційних збудників бактеріальної і вірусної природи та пошуку структурно-функціональних маркерів у їхньому геномі. Швидка ідентифікація, визначення резистентності та особливо множинної лікарської стійкості патогенів до лікарських препаратів є надзвичайно важливою для оцінки інтенсивності епізоотологічного та епідеміологічного процесів, встановлення причин спалахів інфекцій, вибору ефективної методики антибактеріальної терапії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у тісному зв'язку з науково-дослідними темами ДУ “Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України”: АМН 40/2001 “Розробка молекулярно-генетичних тест-систем для раннього виявлення збудників туберкульозу і генотипування мікобактерій”, номер держреєстрації 0101U001328; АМН 47/2002 “Вивчення геномної організації *Bacillus anthracis* та розробка молекулярно-генетичних тест-систем для детекції та типування збудника сибірської виразки”, номер держреєстрації 0102U001570; АМН 59/2004 “Вивчення геномної організації та розробка молекулярно-генетичних тест-систем для детекції та типування коронавірусу людини, зчепленого з тяжким гострим респіраторним синдромом”, номер держреєстрації 0104U002959; АМН 72/2007 “Розробка молекулярно-генетичних тест-систем для детекції резистентних до протитуберкульозних антибіотиків мікобактерій та вивчення неканонічних структур у геномі мікобактерій”, номер держреєстрації 0107U001637; НДР ЦФ.4.26.98 “Розробка методу ранньої молекулярної діагностики та ідентифікації лістерій. Вивчення особливостей організації геному збудника”, номер держреєстрації 0198U002480; АМН 95/2010 “Створення молекулярно-генетичних наборів для детекції резистентних мікобактерій туберкульозу та інших патогенів і визначення потенційних неканонічних структур у їхньому геномі”, номер держреєстрації 0110U001417; а також в рамках наукового співробітництва з університетом Монтани (США), Інститутом досліджень туберкульозу (Китай), Федеральним науково-дослідним центром вірусних захворювань тварин (Німеччина), Національним інститутом ветеринарії (Польща).

Автор був виконавцем та відповідальним виконавцем науково-дослідних робіт, які виконували в ДУ “ІМІ ім. І.І. Мечникова АМН України”, та співавтором розроблених і запатентованих тест-систем для детекції бактерій та вірусів.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягає в створенні надійних технологій ранньої детекції та генотипування мікобактерій туберкульозного комплексу, протеїв, ретровірусів та інших соціально значущих патогенів і розробці підходів до структурної диференціації геному патогенів людини і тварин на основі визначення молекулярно-генетичних маркерів.

Об'єктом дослідження є особливості структурної організації секвенованих послідовностей плазмід та геномного матеріалу патогенів людини і тварин бактеріальної та вірусної природи, геномна ДНК мікобактерій туберкульозного комплексу, представників групи *Bacillus cereus sensu lato*, протеїв, провірусна ДНК вірусів імунodefіциту та лейкозу великої рогатої худоби.

Предметом дослідження є молекулярно-генетичні маркери для типування та детекції патогенів людини і тварин різної природи, а також особливості структурної організації їх геномів.

Для досягнення зазначеної мети, зважаючи на існуючий стан проблеми, у роботі були поставлені та вирішені наступні задачі:

1. Розробити методичні підходи до пошуку та вивчення неканонічних структур в структурно-функціональній організації геному патогенів.

2. Встановити та вивчити розподіл потенційних термодинамічно стабільних досконалих та недосконалих шпилькових структур в геномі мікобактерій туберкульозу і молекулах РНК, які транскрибуються при реплікації плазмід збудника сибірської виразки, що визначають вірулентність бацил, та створити карти їхньої локалізації.

3. Визначити розподіл потенційних шпилькових структур у геномі ретровірусів великої рогатої худоби та коронавірусів людини і тварин.

4. Встановити та проаналізувати розподіл поліпуринових/поліпіримідинових послідовностей з потенціалом утворення міжланцюгових триплексів в геномі ретровірусів великої рогатої худоби.

5. Визначити молекулярно-генетичні маркери для родо- та видоспецифічної детекції важливих для молекулярної медицини бацил групи *Bacillus cereus sensu lato*, протеїв (патогенів сечостатевої системи людини), лістерій (харчових патогенів) та розробити системи праймерів для їхнього генотипування.

6. Розробити молекулярні технології для детекції чутливих/резистентних мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозного препарату першого ряду ізоніазиду та визначення точкових мутацій, асоційованих з резистентністю до даного препарату, у відповідному гені.

7. Визначити фрагменти геному як потенційні маркери для генотипування мікобактерій туберкульозного комплексу, що циркулюють у Європі, та розробити схему диференціації *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. bovis* та *M. caprae* на основі стандартної полімеразної ланцюгової реакції.

8. Визначити фрагменти геному вірусу імунодефіциту (ВІ) великої рогатої худоби (ВРХ) для детекції провірусної ДНК ВІ ВРХ, виділеної від експериментально інфікованих тварин.

9. Провести генотипування вірусу лейкозу (ВЛ) ВРХ, циркулюючого на території України.

Методи дослідження. Для вирішення поставлених у дисертаційній роботі задач було застосовано наступні теоретичні та експериментальні методи дослідження. Комп'ютерний аналіз використовували для пошуку потенційних маркерів для генотипування, визначення розподілу неканонічних структур у геномі патогенів людини і тварин, а також для побудови філогенетичних дерев. Стандартну полімеразну ланцюгову реакцію та її модифікації з наступним аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів та секвенуванням амплікона застосовували для типування бактерій та вірусів. Візуалізацію триплексів та шпилькових структур здійснювали за допомогою атомно-силової мікроскопії. Характеризацію олігонуклеотидних дуплексів з LNA-мономерами та LNA-модифікованих олігонуклеотидів проводили за допомогою УФ-спектроскопії з термічною денатурацією та методом мас-спектрометрії з матрично-активованою лазерною десорбцією/іонізацією (МАЛДІ-мас-спектрометрії) відповідно.

Наукова новизна одержаних результатів. В процесі виконання досліджень отримано низку нових наукових результатів, які істотно розширюють наші уявлення щодо структурної організації геному патогенів вірусної і бактеріальної природи. Серед них зазначимо наступні.

- Вперше детально охарактеризовано термодинамічно стабільні досконалі та недосконалі шпилькові структури, що можуть виникати в молекулах РНК, що транскрибуються з плазмід рХО1 та рХО2, які визначають вірулентність штамів збудника сибірської виразки, та представлено фізичні карти плазмід з локалізованими потенційними шпильковими структурами. Показано, що низка шпилькових структур локалізована всередині температурно-чутливого мотиву мініреплікону рХО1, де одна з них може виконувати роль РНК-термометра.

- Вперше створено карти локалізації потенційних шпилькових структур (які є одним з ланцюгів сигнальних механізмів функціонування геному) та визначено їх розподіл у геномі деяких коронавірусів тварин (вірусів гепатиту миші, епідемічної діареї свині, трансмісивного гастроентериту, бичачого коронавірусу) та людини (вірус тяжкого гострого респіраторного синдрому, ТГРС), ретровірусів ВРХ – ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ. Показано, що ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ характеризуються різним кількісним та якісним складом шпилькових структур. Висунуто гіпотезу щодо можливості існування РНК-термометрів в геномі вірусів. Ідентифіковано потенційну шпилькову структуру в геномі вірусу ТГРС, яка може виконувати роль РНК-термометра.

- Вперше визначено розподіл потенційних досконалих триплексів у провірусній ДНК ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ та представлено фізичні карти зазначених ретровірусів з локалізованими триплексами. На основі аналізу створених карт локалізації потенційних триплексів показано, що розподіли триплексів у геномах ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ відрізняються якісно та кількісно.
- На основі аналізу отриманих розподілів триплексів та шпилькових структур ретровірусів великої рогатої худоби, коронавірусів людини і тварин розроблено принципово новий метод структурної диференціації бактерій та вірусів. Висловлено гіпотезу, що порівняння розподілів триплексів та шпилькових структур може служити ще одним інструментом (поряд з філогенетичним аналізом) дослідження еволюційних взаємовідносин та геномної організації патогенів людини і тварин. Запропоновано нову теоретичну модель утворення подвійного триплекса для випадку короткого лінкерного дуплекса на прикладі провірусної ДНК вірусу імунodefіциту ВРХ.
- Важливим є висновок щодо використання топології філогенетичного дерева для нуклеотидних послідовностей як показника надійності та точності таксономічної класифікації видів та підвидів мікроорганізмів.
- Вперше проведено типування вірусу лейкозу великої рогатої худоби, циркулюючого в Україні, який віднесено до австралійського підвиду, одного з трьох відомих підвидів ВЛ ВРХ.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблені способи виявлення геномних нуклеїнових кислот значущих патогенів людини і тварин можуть бути застосовані при проведенні епідеміологічних та діагностичних досліджень в системі закладів охорони здоров'я і ветеринарної медицини.

Створені набори праймерів для генотипування за допомогою стандартної полімеразної ланцюгової реакції мікобактерій туберкульозного комплексу, що циркулюють у Європі, – *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. bovis* та *M. caprae* – можуть бути використані в системі обласних протитуберкульозних диспансерів МОЗ України, кафедр фтизіатрії та пульмонології інститутів НАМН України з метою впровадження ефективної та швидкої детекції збудників туберкульозу на доповнення до існуючої в Україні системи діагностики цього соціально значущого захворювання.

Розроблена технологія детекції чутливих і резистентних до ізоніазиду та ізолятів дикого типу мікобактерій туберкульозу має насамперед важливе методологічне значення та може застосовуватися у санітарно-епідеміологічній службі для швидкого призначення відповідних хіміотерапевтичних препаратів (до яких мікобактерії туберкульозу не виявляють стійкості) та для контролю ефективності протитуберкульозної терапії, а також в епідеміологічних дослідженнях та в ДНК-діагностиці туберкульозу.

Отримані результати доцільно включити до курсів лекцій з лабораторної діагностики, молекулярної медицини, молекулярної та медичної мікробіології, молекулярної біотехнології, молекулярної біології для студентів медичних і біологічних факультетів університетів та слухачів курсів підвищення кваліфікації академій післядипломної освіти.

Розроблені нові системи праймерів для детекції вірусу імунodefіциту великої рогатої худоби можуть бути використані (після проведення комісійних випробувань) в лабораторіях молекулярної діагностики та ветеринарної медицини, оскільки тест-системи для детекції цього ретровірусу відсутні в інститутах Національної академії аграрних наук України та організаціях, підпорядкованих Державному комітету ветеринарної медицини.

Створені набори праймерів для родо- та видоспецифічної детекції протеїв, патогенів сечостатевої системи людини, застосовували при проведенні досліджень в університеті Монтани (США), медичному університеті Белостоку (Польща). Вони можуть бути використані у центрах з молекулярної діагностики (за умови проведення відповідних лабораторних

випробувань), оскільки зазначені системи праймерів відсутні на ринку молекулярно-генетичних тест-систем України.

Розроблені набори праймерів для видоспецифічної детекції патогенних і непатогенних лістерій можуть бути використані у молекулярно-біологічних лабораторіях МОЗ України (за умови проведення відповідних випробувань) для підвищення рівня лабораторної діагностики лістеріозу та створення ефективної системи санітарно-епідеміологічного контролю за розповсюдженням цієї інфекції.

Результати з типування збудників інфекційних захворювань використовують у Харківському національному медичному університеті в курсах лекцій та практичних занять з мікробіології, вірусології та імунології.

Розроблені оригінальні та прості підходи створення наборів праймерів можуть бути застосовані при конструюванні молекулярно-генетичних тест-систем для генотипування інфекційних збудників різної природи, раннього виявлення онкологічних захворювань, обумовлених точковими мутаціями у геномній ДНК, та інших захворювань, зчеплених з поліморфізмом поодиноких нуклеотидів. Низка визначених шпилькових структур може застосовуватися як специфічні шпилькові зонди при проведенні ПЛР у реальному часі з використанням технології молекулярних маяків та праймерів у форматі “скорпіон”.

Особистий внесок здобувача. В основу дисертації покладено дослідження, що виконано автором в ДУ “Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України” за період 2000 – 2010 рр. Особистий внесок дисертанта полягає у розробці методичних підходів до пошуку молекулярних мішеней для наступної ампліфікації фрагментів геномної та провірусної ДНК патогенів бактеріальної та вірусної природи, обґрунтуванні мети та задач дисертаційної роботи, а також визначенні критеріїв пошуку потенційних неканонічних структур в геномі патогенів. Розробка молекулярно-діагностичних маркерів проводилась автором самостійно. На основі аналізу сучасних досягнень в галузі синтезу модифікованих олігонуклеотидів здобувачем запропоновано та впроваджено низку молекулярно-генетичних тест-систем для детекції поширених та небезпечних патогенів людини і тварин.

Наведені у дисертаційній роботі експериментальні та теоретичні результати отримано, а висновки та положення сформульовано автором самостійно [1, 5-7, 10, 12, 13, 15, 17-19, 21-34, 37-39, 41-49]. Результати досліджень з генотипування вірусу лейкозу ВРХ [4, 35] отримано разом з д-рами Geue L., Beier D. (Федеральний науково-дослідний центр вірусних захворювань тварин, Німеччина). Детекцію провірусної ДНК вірусу імунодефіциту ВРХ [2, 11, 33] проводили спільно з д-рами Kuzmak J., Rola M. (Національний інститут ветеринарії, Польща). Дослідження з визначення точкових мутацій у геномі резистентних мікобактерій туберкульозу [23] здійснено спільно з проф. Wu X. (Інститут досліджень туберкульозу, Китай). Частину досліджень з видоспецифічної детекції протеїв виконано спільно з проф. Nocker A. (університет Монтани, США). В роботах [2-49] автором сформульовано мету та задачі досліджень, запропоновано методи та методичні підходи їх досягнення; постановка задачі роботи [1] була здійснена разом з д.м.н., проф. Циганенком А.Я.

Основні експериментальні результати у роботах [3, 14, 16, 20, 36, 40], опублікованих із співавторами, отримані автором разом із д.б.н., с.н.с. Лиманським О.П. Авторіві належать ідеї застосування варіантів ПЛР з LNA-модифікованими праймерами, модифікованої Таq ДНК-полімерази без 5' → 3' та 3' → 5' екзонуклеазної активності, праймерів з 3'-кінцевими блокуючими групами для детекції резистентних мікобактерій туберкульозу, що веде до підвищення дискримінуючої потужності наборів праймерів. В усіх роботах авторка брала участь в обговоренні отриманих результатів, підготовці та написанні статей.

Планування дисертаційної роботи, вибір методичних підходів та визначення критеріїв пошуку триплексів та термодинамічно стабільних досконалих та недосконалих шпилькових

структур у геномі інфекційних збудників, а також обговорення результатів з генотипування патогенів здійснювали разом з науковим консультантом д.б.н., с.н.с. Лиманським О.П.

Автор висловлює подяку к.б.н., с.н.с. Степаншиній В.М. (Державний науковий центр прикладної мікробіології та біотехнології, Росія) за люб'язно надану колекцію ДНК ізолятів дикого типу та резистентних мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозного препарату ізоніазиду та колекцію ДНК *B. anthracis*, проф. Wu X. (Інститут досліджень туберкульозу, Китай) за плідне співробітництво з перевірки розробленої технології детекції точкових мутацій в геномі мікобактерій туберкульозу, д.ф.-м.н., проф. Покровському В.О. та Фесенко Т.В. (Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України) за допомогу в проведенні досліджень модифікованих олігонуклеотидів МАЛДІ-мас-спектрометрією, д.б.н., с.н.с. Лиманському О.П. за детальні дискусії та корисні поради, д.ф.-м.н., с.н.с. Косевич М.В. та д.б.н., проф. Сиволобу А.В. за критичні зауваження та коментарі, а також д.м.н., проф. Волянському Ю.Л. за всебічну підтримку в процесі виконання дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації неодноразово доповідались на засіданнях Вченої ради ДУ “Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України” (2008-2010 рр.), а також були представлені автором у вигляді доповідей та обговорені на нижченаведених конференціях: 10-ому Українському біохімічному з’їзді (м. Одеса, Україна, 2010); 1-ому Міжнародному симпозиумі “Supramolecular and nanochemistry: toward applications” (м. Харків, Україна, 2008); 5-ій Всеросійській науково-практичній конференції “Генодиагностика инфекционных болезней” (м. Москва, Росія, 2004); Міжнародній конференції “Microtechnologies for the New Millennium Symposium, Bioengineered and Bioinspired Systems” (м. Маспаломас, Іспанія, 2003); конференціях для молодих науковців, аспірантів та студентів з молекулярної біології і генетики (м. Київ, 2001, 2003); 3-ій Міжнародній науково-практичній конференції “Наука і соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія” (м. Харків, 2003); 1-ому конгресі Європейського товариства мікробіологів (м. Любляна, Словенія, 2002); семінарі по іноваційним технологіям та технічним засобам для боротьби з тероризмом (м. Харків, 2002).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 49 наукових праць, у тому числі 22 статті у фахових наукових журналах, з яких 3 статті опубліковано без співавторів, 1 науково-методичний посібник, 19 тез доповідей на наукових конференціях, отримано 7 патентів України.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, дев’яти розділів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Повний обсяг роботи становить 380 сторінок комп’ютерного тексту, з яких текст займає 306 сторінок. Дисертацію проілюстровано 89 рисунками та 44 таблицями. Список використаної літератури обсягом 63 сторінки охоплює 581 джерело. Загальний обсяг семи додатків становить 12 сторінок.

Перелік умовних скорочень: АС-ПЛР – алель-специфічна полімеразна ланцюгова реакція; ВІ ВРХ – вірус імунодефіциту великої рогатої худоби; ВЛ ВРХ – вірус лейкозу великої рогатої худоби; ДНКП – ДНК-полімераза; МТБ – мікобактерії туберкульозу; МТК – мікобактерії туберкульозного комплексу; ПДРФ – поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів; $T_{\text{відп}}$ – температура відпалу (праймера); LNA – locked nucleic acid.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури висвітлено сучасні дані про фенотипові та молекулярно-генетичні методи, які застосовують для виявлення та диференціації патогенів бактеріальної та вірусної природи. Особливу увагу приділено різним форматам алель-специфічної ПЛР. Проведено аналіз літератури, що стосується утворення потенційних шпильок

та триплексів в геномі патогенів, біологічної ролі цих неканонічних структур та можливості їхнього використання як молекулярних маркерів.

Матеріали і методи досліджень. *Комп'ютерний аналіз.* Філогенетичний аналіз, множинне вирівнювання та наступний статистичний аналіз, пошук неканонічних структур (триплексів, термодинамічно стабільних досконалих та недосконалих шпилькових структур) в плазмідах, геномі вірусів та бактерій проводили на основі комп'ютерного аналізу нуклеотидних послідовностей генів та їх фрагментів за допомогою ліцензійного пакета прикладних програм GeneBee (МДУ ім. М.В. Ломоносова, Росія), термодинамічний аналіз праймерів та ампліконів – за допомогою програм MeltCalc (E. Schutz та N. von Ahsen, 1999; <http://www.meltcalc.com>), Exiqon (“Exiqon”, Данія; <http://www.exiqon.com>) та Oligo (версія 3.0, США). При цьому вважали, що для шпильок РНК найбільш вигідною є петля з 6-7 нуклеотидів, (Кантор Ч. та Шиммел П., 1985), в той час як для шпильок ДНК розмір найвигіднішої петлі дорівнює 4-5 нуклеотидам. Для передбачення вторинної структури РНК, оцінки температури плавлення та розрахунку термодинамічних параметрів потенційних шпилькових структур використовували програму mfold (Mathews D. et al., 2004; <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/tna-form1.cgi>).

Побудову філогенетичних дерев на основі нуклеотидних послідовностей після множинного вирівнювання за допомогою вбудованої в пакет програм MEGA4 програми ClustalW проводили з використанням методу найближчого зв'язування (“neighbor-joining”) та методу мінімальної еволюції (Saitou N. and Nei M., 1987), реалізованих в пакеті MEGA 4.0 (Tamura K. et al., 2007). Попарні генетичні відстані між послідовностями були визначені за двохпараметрової моделі Кімури (Kimura M., 1980), у якій приймаються у розрахунок трансверсійні та трансзиційні заміни. Статистичну вірогідність отриманих дерев оцінено за допомогою бутстреп-аналізу шляхом побудови 4000 альтернативних дерев. Для підтвердження надійності побудованих філогенетичних дерев за допомогою пакета GeneBee вибірково проведено побудову деяких з них за допомогою пакета MEGA4. Порівняння філогенетичних дерев, отриманих за допомогою зазначених пакетів, показало, що побудовані дендрограми добре узгоджуються та не мають принципових розбіжностей.

Для аналізу гена *gyrB* хромосомної ДНК мікобактерій туберкульозного комплексу (МТК) вибрано нуклеотидні послідовності ізолятів *M. tuberculosis* (26 ізолятів), *M. bovis* (4), *M. canettii* (3), *M. microti* (2), *M. caprae*, *M. africanum*, що повільно ростуть, а також ізолятів *M. avium* та *M. intracellulare*, які мали фрагменти гена *gyrB*, що перекривалися.

З наведених у базах даних DDBJ, EMBL, GenBank понад 90 нуклеотидних послідовностей ізолятів вірусу імунodefіциту великої рогатої худоби для аналізу вибрано 12 ізолятів гена *env*, а також 14 ізолятів гена *pol*.

У роботі використано послідовності 4 повністю секвенованих ізолятів плазмиди pXO2 (довжина становить приблизно 94 тисячі пар нуклеотидів, т.п.н.) та 6 ізолятів плазмиди pXO1 (довжина приблизно 182 т.п.н.) збудника сибірської виразки; послідовності гена β -лактамази для 7 ізолятів *P. mirabilis*, трьох ізолятів *P. vulgaris*, одного ізоляту *P. penneri*; нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК 8 ізолятів *P. mirabilis* та 4 ізолятів *P. vulgaris*; гена *gyrB* двох ізолятів *P. mirabilis*, що мали спільні фрагменти, ізоляту *P. vulgaris*, ізолятів *Morganella sp.* та *Providencia sp.*; ізолятів генів *iap*, лістеріолізину (цитолізину, фаголізину) лістерій (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. welshimeri*); нуклеотидні послідовності повністю секвенованих ізолятів коронавірусів (вірусу тяжкого гострого респіраторного синдрому, бичачого коронавірусу, вірусу трансмісивного гастроентериту, вірусу інфекційного бронхіту, вірусу епідемічної діареї свині, коронавірусу миші, коронавірусу кішки).

Пошук міжланцюгових триплексів проводили за формулами $R_n \cdot N_k \cdot R_n$ та $Y_n \cdot N_k \cdot R_n$, де R – пурини аденін (A) або гуанін (G), Y – піримідини цитозин (C) або тимін (T). Значення n змінювалося від 4 до 10, а значення k – від 4 до 7.

Підготовка зразків ДНК для проведення ПЛР. ДНК мікобактерій туберкульозного комплексу отримано або фенол/хлороформною очисткою (*M. microti*), або безпосередньо із супернатанту культур клітин після термічної обробки (*M. tuberculosis*, *M. bovis*) та ліофілізовано. Для розчинення ДНК використовували 10 мМ трис·HCl, pH 7,6. Тестування трьох із п'яти розроблених наборів праймерів для детекції мікобактерій туберкульозного комплексу було проведено з застосуванням ДНК різних штамів МТК, наданої проф. М.С. Gutierrez (референс-лабораторія мікобактерій Інституту Пастера, Франція).

Тестування набору праймерів для детекції *B. anthracis* проводили з застосуванням зразків ДНК, екстрагованої з 8 ізолятів *B. cereus*, *B. pseudomycoides*, *B. anthracis*, 6 ізолятів *B. thuringiensis*, двох ізолятів *B. weihenstephanensis*, *B. fluorescens*, *B. mycoides*, отриманих від д-ра Barker M. (університет Heriot-Watt, Шотландія).

Як позитивний контроль для детекції ВІ ВРХ використовували плазмиду з клонованою провірусною ДНК ВІ ВРХ, провірусну ДНК ВІ ВРХ, виділену із трансформованої клітинної лінії тестикулів ВРХ SK40 (RD420), що містила провірусну ДНК ВІ ВРХ ізоляту Florida 112, а також геномну ДНК, яку виділяли з лімфоцитів периферійної крові серопозитивних овець та корів, експериментально інфікованих вірусом імунodefіциту ВРХ. Екстраговану ДНК використовували для проведення одноразової ПЛР з праймерами BIV1-BIV2, а також для постановки гніздової та напівгніздової ПЛР з праймерами 36BIV-PO1BIV та 37BIV-PO2BIV.

Для генотипування ВІ ВРХ лімфоцити периферійної крові 13 голів великої рогатої худоби віком 0,5-2 роки з двох неблагополучних щодо лейкозу господарств Харківської області України використовували як клінічний матеріал. Лейкоцитарну фракцію виділяли з 5 мл цільної крові тварин з добавкою антикоагулянту (56 мМ цитрат Na, 166 мМ глюкоза) шляхом центрифугування у градієнті фіколл-верографін за 1500 g протягом 20 хв. Геномну ДНК ВРХ екстрагували за допомогою наборів для виділення ДНК (Nucleospin Blood, "Macherey-Nagel GmbH" та "Co KG", Duren, Німеччина). Виділену ДНК використовували для проведення гніздової ПЛР з праймерами ENV1-ENV4, комплементарними гену *env* вірусу лейкозу ВРХ, з праймерами LTR1-LTR4, комплементарними довгим кінцевим повторам.

Розроблені набори праймерів для генотипування протеїв було тестовано на шести штамх *Proteus mirabilis* та *P. vulgaris*, отриманих від SGSC (Salmonella Genetic Stock Centre, університет Калгарі, Канада) та університету Монреалю (Канада). Штами *Proteus sp.*, надані SGSC, мають такі характеристики: *P. mirabilis* – штам 412, генотип 0:5c; *P. mirabilis* – штам PL050596; *P. vulgaris* – штам M12, клінічний ізолят, виділений при інфекції сечового тракту; *P. vulgaris* – штам ATCC 13315, що продукує ендонуклеази рестрикції Pvu I та Pvu II, чутливий до гентаміцину, має специфічність до сечовини. Клінічні штами, надані університетом Монреалю, не охарактеризовано.

Хромосомну та плазмідну ДНК *P. vulgaris* та *P. mirabilis* екстрагували за допомогою наборів для виділення ДНК ("ДНК-технологія", а також "Ізоген", Росія). Виділену ДНК використовували для проведення стандартної ПЛР з наборами родоспецифічних праймерів для детекції бактерій роду *Proteus*, а з наборами видоспецифічних праймерів – для детекції *P. mirabilis* та *P. vulgaris*. Для цього використовували набір родоспецифічних праймерів Pr1-Pr2, комплементарних гену *gyrB* *P. mirabilis* та *P. vulgaris*, а також видоспецифічні праймери Pr4-Pr5, комплементарні гену β-лактамази *P. vulgaris*, та видоспецифічні праймери Pr6-Pr7, комплементарні гену 16S рРНК *P. mirabilis*.

Генотипування та детекцію вірусів і бактерій здійснювали за допомогою різних варіантів ПЛР (стандартної ПЛР, ПЛР з поліморфізмом довжини рестрикційних фрагментів,

ПЛР з секвенуванням амплікона, ПЛР у реальному часі, ПЛР з додатковим блокуючим праймером, ПЛР з LNA-модифікованими праймерами). Набори праймерів було тестовано на відповідних негативних та позитивних контрольних зразках ДНК, екстрагованої з шести штамів *P. mirabilis* та *P. vulgaris*, мікобактерій туберкульозного комплексу, бацил групи *Bacillus cereus sensu lato*, плазміді з клонованою провірусною ДНК ВІ ВРХ, ДНК з культури клітин, інфікованих ВІ ВРХ, ДНК з лімфоцитів експериментально інфікованих вірусом імунодефіциту ВРХ овець та ВРХ, геномній ДНК з лімфоцитів крові ВРХ, інфікованої вірусом лейкозу ВРХ.

ПЛР з гарячим стартом проводили на ампліфікаторах GeneAmp 9700 (“Perkin Elmer Inc.”, США), моделі 480 (“Perkin-Elmer, Inc.”, Німеччина), Амплі-4L (“Біоком”, Росія), “Терцик” (“ДНК-технологія”, Росія), а також ампліфікаторі НВО “Точність” (Росія).

Праймери для детекції та типування ВІ ВРХ, протеїв, МТК були синтезовані на синтезаторі ASM-102 (“Биоссет”, Росія) та очищені шляхом електрофорезу у ПААГ (“Синтол”, Росія). Праймери для типування ВІ ВРХ отримано від “MWG Biotech” (Німеччина).

Стандартну ПЛР для детекції мікобактерій туберкульозного комплексу проводили на ампліфікаторі НВО “Точність” (Тула, Росія) за наступних температурних та часових параметрів: початкова інкубація – 95 °С, 3 хв.; денатурація – 95 °С, 1 хв.; відпал – 60-62 °С, 1 хв.; синтез – 74 °С, 1,3 хв.; кількість циклів – 45. Для наборів праймерів Мус1 – Мус3 та Мус1 – Мус4 проводили двохкрокову ПЛР за таких параметрів: початкова інкубація – 94 °С, 3 хв.; денатурація – 94 °С, 1 хв.; відпал та синтез – 71 °С, 2 хв.; кількість циклів – 45. Температуру відпалу праймерів ($T_{\text{відп}}$) оптимізували шляхом постановки ряду реакцій при збільшенні температури відпалу з кроком 2 °С– 0,5 °С до повної елімінації смуги неспецифічного амплікона. Для проведення ПЛР використовували універсальний набір реагентів для ПЛР (“Ізоген”, Росія), до складу якого входить термостабільна ДНК-полімераза (ДНКП), інгібована антитілами, що дає можливість постановки ПЛР з гарячим стартом. ПЛР проводили в об’ємі реакційної суміші 25 мкл при концентрації праймерів 0,5 мМ. Візуалізацію ампліконів здійснювали шляхом електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі з наступним фарбуванням етидієм бромистим. Використовували набір маркерів молекулярної маси М100 (“Ізоген”, Росія).

Поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів. Для визначення підвидової належності ізолятів ВІ ВРХ 10 мкл продукту ампліфікації гена *env* довжиною 444 п.н., обмеженого внутрішніми праймерами ENV3-ENV4, після проведення гніздової ПЛР безпосередньо піддавали гідролізу з 5 од. ферментів рестрикції Bcl I, Pvu II та BamH I (“Boehringer Mannheim”, Німеччина).

Детекція резистентних мікобактерій туберкульозу. Для перевірки розроблених наборів праймерів для детекції ізолятів дикого типу та мутантних (резистентних до протитуберкульозного препарату першого ряду ізоніазиду) мікобактерій туберкульозу використовували ДНК, екстраговану з 43 ізолятів *M. tuberculosis*, що містять точкові мутації в кодоні 315 гена *katG*, асоційовані з резистентністю до даного препарату. Ізоляти ДНК резистентних до ізоніазиду штамів *M. tuberculosis* містять мутації AGC → ACC, AGC → ACG та AGC → AGA в кодоні 315 гена *katG* та характеризуються рівнем резистентності до ізоніазиду 1 – 25 мкг/мкл. В тому числі, використовували ДНК *M. tuberculosis* штаму HB385, що містить мутацію AGC → AGA в кодоні 315 гена *katG*; ДНК *M. tuberculosis* штаму HB125 з мутацією AGC → ACC; ДНК *M. tuberculosis* штаму H37Rv, негативний контроль ампліфікації (кодон 315 містить послідовність AGC).

LNA-модифіковані праймери (“Синтол”, Росія), містили по 3 – 5 LNA-нуклеотидів виробництва фірми “Exiqon” (Данія; <http://www.exiqon.com/lna-technology>). Температуру плавлення комплексу LNA-модифікований олігонуклеотид – одониткова ДНК розраховували за допомогою програми, що є у вільному доступі на сайті <http://www.exiqon.com/oligo-tools>, <http://lna-tm.com>.

ПЛР проводили в об'ємі реакційної суміші 20 – 50 мкл, що містила 4 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 12 мМ трис·HCl (pH 8,0), 2 мМ MgCl₂, 200 мкМ дезоксинуклеотидів, 0,1 – 0,5 мкМ кожного праймера, 1 од. Таq ДНК-полімерази. Стандартну ПЛР проводили за таких температурних та часових параметрів: початкова інкубація – 95 °С, 2 хв.; денатурація – 95 °С, 40 сек.; відпал – 58 – 70 °С, 40 сек.; синтез – 70 – 74 °С, 40 сек.; кількість циклів – 38 – 45. Для ампліфікації використовували 0,05 мкг геномної ДНК мікобактерій туберкульозу.

Секвенування ДНК. Послідовність ампліконів була визначена за допомогою набору для секвенування, що містить праймери ENV3 та ENV4 з флуоресцентно міченим барвником (“MWG Biotech”, Німеччина). Пряму послідовність ампліфікованого фрагмента гена *env* провірусної ДНК ВЛ ВРХ визначали за допомогою праймера BLV3, а комплементарну – за допомогою праймера BLV4, які були мічені барвником IRD800. Реакцію секвенування проводили за допомогою набору для секвенування Thermo Sequenase DYEnamic (“Amersham Pharmacia Biotech”, Німеччина). ПЛР-продукти були секвеновані як мінімум двічі для прямої та комплементарної ниток та проаналізовані на ДНК-секвенаторі LI-COR 4200 (“MWG Biotech”, Німеччина). Консенсусна послідовність була отримана за допомогою пакета програм LaserGene 99, версія 5.03 (“DNA Star”, США).

Результати досліджень та обговорення.

Диференціація мікобактерій туберкульозного комплексу. Оскільки *M. tuberculosis*, *M. microti* та *M. bovis* є близькоспорідненими видами, то стратегія їхньої диференціації полягала у конструюванні для кожного виду пари праймерів, один з яких є комплементарним послідовності кожного із видів, а другий має на 3'-кінці нуклеотид, комплементарний до відповідного нуклеотида тільки для одного виду МТК. При цьому використовується відносна нездатність Таq ДНКП подовжувати праймер, що має на 3'-кінці нуклеотид, некомплементарний нуклеотиду матриці. Зазначена технологія, ефективність якої підтверджено експериментально, була також використана при конструюванні праймерів для диференціації близькоспоріднених видів протеїв. На основі результатів комп'ютерного аналізу цих секвенованих послідовностей гена *gyrB* ізолятів мікобактерій туберкульозного комплексу (рис. 1), що були на час проведення комп'ютерного аналізу у базі даних, та наступного термодинамічного аналізу було сконструйовано три прямих та п'ять зворотних (видоспецифічних) праймерів, комбінації яких дозволяють здійснювати видову ідентифікацію МТК.

Важливо також, що ізоляти гена *gyrB* представників 5 видів МТК утворюють 5 окремих кластерів, які не перекриваються, на дендрограмі (рис. 2), що свідчить про правильну ідентифікацію досліджуваних видів. У даному випадку філогенетичний аналіз був використаний для контролю коректності видової ідентифікації ізолятів МТК. При неправильній класифікації видів ізоляти одного виду можуть знаходитися усередині кластера ізолятів іншого виду, що вказує на те, що філогенетично віддаленіші види характеризуються більшою подібністю нуклеотидних послідовностей, ніж близькоспоріднені види.

Рис. 1. Фрагмент множинного вирівнювання гена *gyrB* для ізолятів *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. bovis* та *M. caprae*. Наведений зворотний праймер Мус6 має некомплементарний (“хитний”) нуклеотид на 3'-кінці (для ізолятів *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. canettii* та *M. caprae*), що дозволяє здійснювати видоспецифічну детекцію *M. bovis* шляхом ПЛР з набором праймерів Мус9 – Мус6. Для ізолятів наведено номери у базі даних GenBank (за винятком лабораторних штамів H37Rv та H37Ra). Точками показано нуклеотиди, що збігаються з консенсусною послідовністю ізоляту *M. bovis* (AB014184). Підкреслено комплементарну до праймера послідовність “+”-нитки ДНК. Однаковим шрифтом виділено ізоляти, які віднесено до одного виду. Нуклеотиди мішені, які можуть утворювати неканонічну пару з 3'-кінцевим нуклеотидом праймера Мус6, виділено сірим кольором.

Результати тестування розроблених праймерів для *M. tuberculosis*, *M. bovis* та *M. microti* показали принципову можливість їх використання для диференціації указаних патогенів шляхом стандартної ПЛР (рис. 3 та 4). В той же час необхідно зазначити, що для елімінації неспецифічних ампліконів вкрай важливим є точний вибір $T_{\text{відп}}$ праймера.

Інтервал плавлення коротких олігонуклеотидів становить близько 10 °С. В той же час теоретично визначена різниця у температурах плавлення для досконалого дуплекса (комплексу праймер – одонитковий амплікон) та дуплекса з неспареним нуклеотидом на 3'-кінці праймера для більшості недосконалих дуплексів з розробленими праймерами для диференціації близькоспоріднених видів мікобактерій туберкульозного комплексу становить 3,1 °С – 4,6 °С. Тому для мінімізації відпалу праймера з утворенням недосконалих дуплексів (що характеризуються зниженою температурою плавлення) необхідним є визначення оптимальної $T_{\text{відп}}$ праймера в конкретних умовах, які залежать від типу ампліфікатора, іонної сили реакційного буфера.

Важливо, що комплекс праймера з одонитковою ДНК-матрицею у випадку наявності

Рис. 2. Філогенетичний аналіз штамів *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. bovis* та *M. caprae*. Філограма побудована на основі послідовності гена *gyrB* довжиною 1257 п.н. Ізоляти кожного виду мікобактерій знаходяться усередині одного кластера.

точкової мутації характеризується більш низькою температурою плавлення порівняно з досконалим дуплексом. На цьому базується методика селективної ампліфікації послідовностей, які відрізняються поодиноким нуклеотидом. Специфічність та точність ПЛР-аналізу ще більше підвищуються, якщо на 3'-кінці одного або обох праймерів локалізований неспарений нуклеотид (рис. 3). У цьому випадку ДНК-полімераза синтезує з набагато меншою ефективністю порівняно з досконалим дуплексом.

Таким чином, у роботі на основі гена *gyrB* розроблено п'ять наборів праймерів для видоспецифічної детекції близькоспоріднених мікобактерій туберкульозного комплексу *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. bovis* та *M. caprae* за допомогою стандартної ПЛР. Проведення ПЛР з праймерами, що мають хитні 3'-кінцеві нуклеотиди (комплементарні кінцевому нуклеотиду нитки ДНК тільки певного виду мікобактерій), дозволяє здійснювати генотипування МТК при коректному виборі температури відпалу праймерів.

Детекція чутливих та резистентних до ізоніазиду мікобактерій туберкульозу. Аналіз літературних даних показав, що резистентність одного з стандартних протитуберкульозних препаратів першого ряду ізоніазиду, який застосовують для хіміотерапії при захворюванні на туберкульоз, асоційована з мутаціями в кодоні 315 гена *katG* *M. tuberculosis* з вірогідністю 50 – понад 90 % (для різних географічних регіонів). В той же час поряд із зазначеними мутаціями виявлено одонуклеотидний поліморфізм в кодоні 463 гена *katG*, також зв'язаний з резистентністю до ізоніазиду.

При розробці наборів праймерів на першому етапі проводили аналіз фрагментів геномної ДНК ізолятів мікобактерій туберкульозу (МТБ) з бази даних секвенованих нуклеотидних послідовностей GenBank. З наведеного фрагмента комп'ютерного аналізу для гена *katG* хромосомної ДНК резистентних до ізоніазиду ізолятів МТБ (рис. 5) видно, що мутацію в кодоні 315 можна використовувати для де текції резистентних до ізоніазиду ізолятів МТБ. Беручи до

Рис. 3. Схема ампліфікації фрагмента ДНК мікобактерій туберкульозного комплексу за допомогою ПЛР з праймерами Мус1-Мус4, специфічними до *M. microti*. Мус1 – прямий, Мус4 – зворотний праймер, специфічність якого визначається 3'-кінцевим нуклеотидом. а – праймер Мус4 відпалюється на ДНК-матриці з утворенням канонічної пари на 3'-кінці тільки

для *M. microti*. б – праймер Мус4 утворює комплекс з ДНК-матрицею з неканонічною АС-парою на 3'-кінці для *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. canettii*. За температури відпалу 71 °С праймер Мус4 не відпалюється на ДНК-матриці зазначених видів, і ампліфікація не відбувається.

уваги літературні дані щодо порівняльного аналізу різних модифікацій ПЛР (Josefsen M., 2009), а також враховуючи, що більшість клінічних лабораторій мають стандартне ПЛР-обладнання, у даній роботі розроблено дві технології детекції точкових мутацій у кодоні 315 гена *katG* МТБ за допомогою алель-специфічної ПЛР (рис. 6). У першому варіанті детекцію поодиноких мутацій в гені *katG* МТБ проводили на основі використання праймерів, що містять LNA-модифіковані нуклеотиди. Другий варіант шляхом проведення ПЛР з додатковим конкурентним блокуючим праймером з 3'-термінальною фосфатною групою дозволяє визначати тип точкових мутацій AGC → ACC та AGC → AGA, AGC → ACA у кодоні 315 гена *katG*, що найчастіше зустрічаються.

Введення LNA-нуклеотидів дозволяє взагалі збільшити дискримінуючу потужність праймера, а введення LNA-мономера на 3'-кінці праймера дозволяє підвищити надійність

Рис. 4. Оптимізація ампліфікації фрагмента ДНК мікобактерій *M. microti* та *M. tuberculosis* після проведення полімеразної ланцюгової реакції з видоспецифічними праймерами Мус1-Мус4 (смуги 1 – 3) та Мус1-Мус3 (смуги 4 – 5) та електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі. Температура відпалу становить: а – 70,5 °С; б – 71 °С. 1 – вода; 2 – ДНК *M. microti*; 3 – ДНК *M. bovis* (негативний контроль ампліфікації при детекції *M. microti*); 4 – *M. tuberculosis*; 5 – *M. bovis* (негативний контроль ампліфікації при детекції *M. tuberculosis*). М – маркер молекулярної маси.

Рис. 5. Фрагмент комп'ютерного аналізу гена *katG* для ізолятів *Mycobacterium tuberculosis* із бази даних GenBank. Наведено номери ізолятів у базі даних (за винятком ізолятів 6 та 7, які надано проф. Wu X. та д-ром Степаншиною В.М. відповідно) та вказано країну, з якої надано секвеновані послідовності. Виділено кодон 315, мутації в якому зчеплені з резистентністю до ізоніазиду. 1-й ізолят – лабораторний штам *M. tuberculosis* H37Rv. Підкреслено позиції одонуклеотидних поліморфізмів.

детекції точкових мутацій за допомогою алель-специфічної ПЛР (АС-ПЛР). В LNA-модифікованих праймерах деякі нуклеотиди заміщені LNA-мономерами – аналогами нуклеотидів, що містять метиленовий місток 2'-О, 4'-С, який обмежує конформаційну гнучкість дезоксирибозного кільця та переводить мономер у жорстку структуру. Це призводить до підсилення гібридизації нитки, що містить LNA-мономери, з комплементарною ниткою

Рис. 6. Формати алель-специфічної ПЛР, що використовували (за винятком 4) для диференціації мікобактерій туберкульозного комплексу та протеїв (1), детекції чутливих/резистентних до ізоніазиду мікобактерій туберкульозу (2), а також для визначення точкових мутацій в геномі МТБ (3).

дуплекса. Вбудовування LNA-нуклеотидів значно збільшує термічну стабільність дуплекса порівняно з немодифікованою ДНК.

АС-ПЛР з LNA-модифікованими праймерами основана на тому, що температура плавлення комплексу праймер – одониткова ДНК-матриця (а отже, і температура відпалу праймерів) для мутантного типу нижча від температури плавлення досконалого дуплекса. Це означає, що за наявності точкової мутації у сайті, що містить LNA-нуклеотид, комплекс праймер – одониткова ДНК-матриця буде мати більш низьку температуру плавлення (T_m)

порівняно з досконалим дуплексом. Стосовно мікобактерій туберкульозу молекули ДНК ізолятів дикого типу є досконалими дуплексами, а ДНК резистентних до ізоніазиду ізолятів характеризується наявністю мутацій у кодоні 315 гена *katG* та, отже, має нижчу температуру плавлення. Важливо зазначити, що величина зміни T_m комплексу LNA-праймер – ДНК-матриця за наявності одонуклеотидного поліморфізму залежить як від кількості LNA-мономерів, так і від довжини праймера (Latorra D. et al., 2003).

Використання ПЛР з набором праймерів Л7 – Л8^{SLNA} дозволяє диференціювати мутантний та дикий тип гена *katG* МТБ: для дикого типу гена *katG* ампліфікується фрагмент гена довжиною 214 п.н. (доріжки 3, 4, рис. 7Б), у той час як для мутантного ізоляту МТБ амплікон відсутній (хоча ампліфікація відбувається, про що свідчить смуга неспецифічного амплікона, яка утворюється внаслідок вибору праймера Л8^{SLNA} невеликої довжини) (доріжки 1, 2, рис. 7Б). Інтенсивність смуги неспецифічного амплікона зменшується при підвищенні $T_{відп}$ від 66 °С до 71 °С (рис. 7; у цьому випадку проводили двокрокову ПЛР, яка дозволяла надійно диференціювати ізоляти МТБ мутантного та дикого типів).

Друга технологія базується на комбінації алель-специфічних праймерів та додаткового

Рис. 7. Детекція продуктів ампліфікації фрагмента гена *katG* ДНК мікобактерій туберкульозу дикого типу (WT) та резистентних (з мутацією в кодоні 315 гена *katG*) до ізоніазиду (МТ) після проведення полімеразної ланцюгової реакції з набором праймерів Л7 – Л8^{SLNA} та електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі. Л8^{SLNA} – модифікований праймер, що містить 5 LNA-нуклеотидів. (а) 1 – маркер молекулярної маси – фрагмент довжиною 151 п.н., що містить кодон 315, після ампліфікації з набором праймерів Mykat10 – Mykat11; 2, 3 – ампліфікація з набором праймерів Л7 – Л8^{SLNA} мутантних по кодону 315 гена *katG* МТБ (2) та дикого типу (3); 4 – негативний контроль ампліфікації. Наявність мутації в кодоні 315 веде до відсутності смуги амплікона довжиною 214 п.н. (2), яка є характерною для ізолятів дикого типу (3). (б) Ампліфікація фрагмента довжиною 214 п.н. з набором праймерів Л7 – Л8^{SLNA} для ДНК мікобактерій туберкульозу, стійких до ізоніазиду (1, 2), та ДНК ізолятів дикого типу (3, 4).

блокуючого олігонуклеотида для пригнічення ампліфікації алелю дикого типу (рис. 8). Ефективність зазначеного підходу перевірено при розробці методу для детекції точкових мутацій в кодоні 315 гена *katG* МТБ. Підвищенню дискримінуючої потужності сприяло використання додаткового термінуючого праймера з 3'-кінцевою фосфатною групою (для елімінації неспецифічного зв'язування) (рис. 9). За умови вибору оптимальної температури відпалу набір праймерів Mykat4– Mykat5–Mykat5P дозволяє диференціювати мутацію AGC → ACC (доріжка 2, рис. 9) від мутації AGC → AGA (доріжка 1, рис. 9) та послідовності AGC в кодоні 315 гена *katG* ДНК мікобактерій туберкульозу (доріжка 3, рис. 9).

На основі розроблених технологій детекції ізолятів дикого/мутантного типу МТБ та визначення типу точкових мутацій, зчеплених з резистентністю до ізоніазиду, запропонована схема аналізу клінічного зразка на наявність МТБ, визначення резистентності до ізоніазиду та уточнення, у випадку наявності, типу точкової мутації. Відмітною особливістю даної схеми є можливість швидкого визначення ізолятів дикого типу МТБ (тобто чутливих до ізоніазиду), що дозволяє для первинних хворих негайно почати проведення курсу хіміотерапії, що включає і

Рис. 8. Схема алель-специфічної ПЛР для визначення точкової мутації AGC → ACC в кодоні 315 гена *katG* з використанням додаткового блокуючого конкурентного зворотного праймера з 3'-термінальною фосфатною групою (для елімінації ампліфікації ДНК алелю дикого типу). 3'-кінцевий нуклеотид специфічного до зазначеної мутації праймера Mykat5 є некомплементарним (А) та комплементарним (Б) до нуклеотида у другій позиції кодону 315.

ізоніазид. Важливо, що раніше для того, щоб встановити належність клінічного ізоляту *M. tuberculosis* до дикого або мутантного типу, необхідно було провести детекцію 6 варіантів точкових мутацій у кодоні 315 гена *katG* МТБ шляхом мультиплексної ПЛР з використанням шести пар праймерів. У той же час використання алель-специфічної ПЛР з розробленими LNA-модифікованими праймерами дозволяє значно спростити конструювання набору праймерів. В останньому випадку достатньо використати тільки одну пару праймерів, один з яких містить 3-5 LNA-нуклеотидів, комплементарних (або фланкуючих та комплементарних) кодону з мутаціями, що досліджують.

Рис. 9. Детекція точкової мутації AGC → ACC в кодоні 315 гена *katG* ДНК мікобактерій туберкульозу, зчепленої з резистентністю до ізоніазиду, після проведення ПЛР з набором праймерів Mykat4–Mykat5–Mykat5P та електрофорезу в 2 % агарозному гелі. 1, 5, 9 – ДНК *M. tuberculosis* штаму HB385, що містить мутацію AGC → AGA; 2, 6, 10 – ДНК *M. tuberculosis* штаму HB125 з мутацією AGC → ACC; 3, 7, 11 – ДНК *M. tuberculosis* штаму H37Rv, негативний контроль ампліфікації (кодон 315 містить послідовність AGC); 4, 8, 12 – вода, негативний контроль ампліфікації. Підкреслено позиції точкових мутацій.

Створені молекулярно-генетичні тест-системи для виявлення резистентних до протитуберкульозних препаратів мікобактерій туберкульозу можуть застосовуватися в діагностичних лабораторіях з стандартним ПЛР-обладнанням та дозволять скоротити визначення лікарської стійкості МТБ з 1-3 місяців традиційними бактеріологічними методами до 1-3 днів за допомогою ПЛР.

Детекція провірусної ДНК вірусу імунodefіциту великої рогатої худоби. ВІ ВРХ є лентівірусом, який інфікує велику рогату худобу та викликає захворювання, подібне до СНІДу, після варіабельної асимптоматичної фази (Gonda M. et al., 1994). Важлива проблема, яка виникає при детекції ВІ за допомогою ПЛР, полягає у складності індикації провірусної ДНК у природно інфікованих вірусом імунodefіциту ВРХ тварин на відміну від експериментально заражених. Спроби знайти ВІ в моонуклеарах крові ВРХ виявились безуспішними, хоча наявність провірусної ДНК ВІ ВРХ було продемонстровано в експериментах на вівцях (Bicka L. et al., 2000). Суперечливі літературні дані з ПЛР-детекції ВІ ВРХ можна пояснити як недосконалістю діагностиків, так і генетичною варіабельністю ВІ ВРХ, яка відіграє істотну роль в персистенції вірусу та його патогенезі (Suarez D. et al., 1997), а також невисокою точністю синтезу вірусної РНК-полімерази.

У даній роботі був створений набір праймерів для надійної ПЛР-детекції провірусної ДНК ВІ ВРХ у експериментально інфікованій ВРХ. У якості мішені для праймерів був вибраний фрагмент гена *pol* ВІ ВРХ довжиною 101 п.н., для якого були відомі послідовності провірусної ДНК, виділеної не тільки з культури клітин, що містять ВІ ВРХ, а і з лімфоцитів експериментально інфікованих тварин. За допомогою стандартної ПЛР амплікон очікуваного розміру був детектований для трансформованої клітинної лінії тестикулів ВРХ, що містить провірусну ДНК ВІ ВРХ з ізоляту Florida 112, для плазмідної ДНК з клонованою провірусною ДНК ізоляту R29 ВІ ВРХ, а також для ДНК, екстрагованої з лімфоцитів периферійної крові серопозитивних овець та корів, що були експериментально інфіковані ВІ ВРХ (рис. 10).

Рис. 10. Детекція продуктів ампліфікації провірусної ДНК ВІ ВРХ після проведення полімеразної ланцюгової реакції з праймерами BIV1-BIV2 та електрофорезу у 2 % агарозному гелі. Доріжка 1 – маркер молекулярної ваги, 100 п.н.; 2 – негативний контроль ампліфікації (H₂O); 3 – ДНК з лімфоцитів вівці, негативною відносно ВІ ВРХ; 4 – ДНК з лімфоцитів вівці, експериментально інфікованої ВІ ВРХ; 5 – ДНК з лімфоцитів ВРХ,

експериментально інфікованої ВІ ВРХ; 6 – плазмід з клонованою провірусною ДНК ізоляту R29 ВІ ВРХ; очікуваний розмір ПЛР-продукту становить 101 п.н.

Аналіз секвенованих фрагментів гена *pol* ВІ ВРХ, що з'явилися відносно недавно, показав, що взаємодія ВІ ВРХ – організм-хазяїн носить складніший характер, ніж вважали раніше. Ізоляти ВІ ВРХ, виділені з клінічного матеріалу від експериментально інфікованих тварин, характеризуються набагато більш високою мінливістю у порівнянні з вірусом, виділеним із культури клітин. Ця генетична варіабельність, що є відмітною властивістю ретровірусів і обумовлює їхній патогенез, найбільш яскраво проявляється при персистенції вірусу в організмі хазяїна.

Справжнє розповсюдження ВІ ВРХ в Україні невідоме через відсутність специфічних реагентів для вірусологічних та серологічних методів ідентифікації ВІ ВРХ. Тому, оскільки ВІ ВРХ, як і інші лентівіруси, характеризується тривалим латентним періодом, для ідентифікації вірусу, контролю за його розповсюдженням, наявністю субвидів можуть бути застосовані молекулярно-генетичні методи на основі ПЛР з використанням створеного набору праймерів.

Генотипування вірусу лейкозу великої рогатої худоби, що циркулює в Україні. ВІ ВРХ, поширений ретровірус, асоційований з летальною формою лейкемії та персистуючим лімфоцитозом (Gillet N. et al., 2007). Одне з перших припущень щодо можливої наявності підвидів вірусу лейкозу великої рогатої худоби було зроблено у роботі (Dube S. et al., 1997) на підставі філогенетичного аналізу гена *pol* ВІ ВРХ. На основі географічного розповсюдження та молекулярно-генетичних характеристик варіанти вірусу лейкозу ВРХ, ізольовані в різних країнах Європи, США, Японії, Саудівській Аравії та Новій Зеландії, було розподілено на три підвиди – японський, австралійський та бельгійський (Beier D. et al., 2001).

У даній роботі вперше проведено ідентифікацію підвиду вірусу лейкозу ВРХ, циркулюючого в Україні, на основі фрагмента гена *env* довжиною 444 п.н. шляхом ПЛР з ПДРФ-аналізом. Фрагмент гена *env* провірусної ДНК був ампліфікований, секвенований та проаналізований після обробки амплікона трьома ферментами рестрикції – *Bam*HI, *Bcl*II, *Pvu*II. Наявність продуктів рестрикції довжиною 316 та 128 п.н. для рестриктази *Bam*HI, довжиною 225 та 219 п.н. для *Bcl*II, а також відсутність рестриктів після обробки рестриктазою *Pvu*II (рис. 11) дозволили віднести ізолят ВІ ВРХ, циркулюючий в Україні, до австралійського підвиду.

Побудова філогенетичного дерева на основі послідовностей фрагмента гена *env* довжиною 444 п.н. ВІ ВРХ (рис. 12) дозволила уточнити результати множинного вирівнювання. Структура дерева дає можливість чітко розрізняти два кластери ізолятів ВІ ВРХ, відповідні бельгійському та австралійському підвидам.

Рис. 11. Рестрикційний аналіз продуктів ампліфікації фрагмента гена *env* провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби довжиною 444 п.н. для 5 ізолятів ВІ ВРХ після проведення гніздової ПЛР з праймерами ENV1-ENV4. Профілі рестрикції отримували обробкою ампліконів ферментами рестрикції *Bam*HI, *Pvu*II та *Bcl*II. М – маркер молекулярної ваги; доріжки 1-4 відповідають бельгійському варіанту ВІ ВРХ (відсутність рестрикції для рестриктази *Bam*HI; наявність рестриктів довжиною 280 п.н. та 164 п.н. для рестриктази *Pvu*II; наявність продуктів довжиною 225 п.н. та 219 п.н. для рестриктази *Bcl*II); доріжка 5 – ізолят Ukraine 1, що відповідає австралійському варіанту ВІ ВРХ.

Український ізолят Ukr1, хоча і віднесений до австралійського підвиду, розташований досить віддалено від кластера австралійських ізолятів, що вказує на те, що послідовність Ukr1 має найбільшу порівняно з іншими ізолятами кількість нуклеотидів, що не збігаються. Проте запропонована раніше схема типування ізолятів ВІ ВРХ на основі ПЛР з ПДРФ-аналізом має деякі недоліки. По-перше, 10 % ізолятів (2 з 20) не можуть бути класифікованими через

нехарактерні профілі рестрикції для того чи іншого підвиду. По-друге, кількість підвидів вірусу, які ідентифікують, повинна збігатися з кількістю чітко розрізнених кластерів ізолятів на філогенетичному дереві. Так, наприклад, у роботах з філогенетичного аналізу підвидів вірусу кліщового енцефаліту (КЕ) з різних регіонів для послідовності гена Е довжиною 1488 п.н. (Nayasaka D. et al., 1999, 2001) переконливо продемонстровано наявність трьох підвидів вірусу КЕ, які на філогенетичному дереві відповідають трьом окремим кластерам ізолятів вірусу КЕ, що не перекриваються. По-третє, для типування вибрано відносно невеликий фрагмент геному ВЛ ВРХ, довжина якого становить близько 5 % від повного геному вірусу лейкозу, що може призводити до неточностей у визначенні підвиду. Також можливо, що неоднозначність у субтипіванні обумовлено вибором висококонсервативного локусу гена *env*. Тому проведення філогенетичного аналізу для варіабельних фрагментів генів *pol*, *gag* або *env* ВЛ ВРХ довжиною 1000-1500 п.н. дозволить зробити типування ізолятів ВЛ ВРХ з більш високою надійністю.

Структурний аналіз геному ретровірусів великої рогатої худоби. Незважаючи на достатньо інтенсивне вивчення локалізації паліндромів (фрагментів ДНК, які утворено

Рис. 12. Філограма фрагментів гена *env* довжиною 444 п.н. провірусної ДНК ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби. Ukr1 – український ізолят ВЛ ВРХ. В дужках вказано підвид, до якого віднесено ізолят на основі ПДРФ-аналізу: япон – японський, авс – австралійський, бел – бельгійський, ? – паттерни рестрикції не дозволяють зробити типування даного ізоляту. Масштаб відповідає 5 замінам на 100 пар нуклеотидів.

симетрично локалізованими інвертованими повторами) у геномі різних організмів, роль та розподіл шпилькових структур у геномі численних вірусів та бактерій залишаються нез'ясованими. Шпилькові структури можуть бути включеними до промоторів та термінаторів транскрипції – наявність шпильок є сигналом для зупинки РНК-полімерази, термінації синтезу РНК-транскриптів з наступною дисоціацією елонгаційного комплексу РНК-полімераза – ДНК – РНК-транскрипт. Виходячи з цього, нами проведено пошук потенційних шпилькових структур та міжланцюгових триплексів у геномі ретровірусів – вірусу лейкозу великої рогатої худоби та вірусу імунodefіциту великої рогатої худоби.

Всі проаналізовані повтори розподілено на два види – досконалі та недосконалі (стебло шпильок яких містить некомплементарні нуклеотиди або делеції нуклеотидів в одному з ланцюгів стебла шпильки). Крім того, повтори диференціювали на дві групи за рівнем вільної енергії шпилькових структур, які вони можуть утворювати. Першу групу складали повтори з вільною енергією ΔG -10 – -15 ккал/моль, а другу – з ΔG від -15 до -20 ккал/моль (такі шпильки відсутні у геномній РНК вірусу лейкозу ВРХ та знайдені тільки у геномі вірусу імунodefіциту ВРХ).

Довжина високостабільних шпильок у геномі ВІ ВРХ варіює від 137 до 26 нуклеотидів, а вільна енергія – від -19,8 ккал/моль до -9,7 ккал/моль. При цьому шпильки однорідно розподілені у геномі ВІ ВРХ – гени *gag*, *pol*, *env* містять 2, 5 та 5 шпилькових структур, а 5'-LTR та 3'-LTR також містять 1 та 2 інвертованих повтори відповідно. Послідовність та вторинна структура двох знайдених у геномі ВІ ВРХ шпилькових структур, вільна енергія яких становить близько -11 ккал/моль, наведені на рис. 13.

Створені карти розподілу інвертованих повторів викликають декілька запитань. По-перше, для ініціації реплікації та термінації транскрипції достатньо двох шпильок на 5'- та 3'-кінцях матричного ланцюга ДНК. В той же час, наприклад, послідовність гена *gag* вірусу імунodefіциту ВРХ містить 6 шпильок. Отже, біологічна функція значного числа знайдених шпильок є невизначеною. По-друге, відсутність шпильок, наприклад, на 5'-кінці ряду генів (зокрема, гена *env* ВІ ВРХ (рис. 14)), свідчить про те, що поряд із шпильками інші неканонічні

структури ДНК (наприклад, триплекси (рис. 15)) можуть виступати сигналами для тригерного переключення та зв'язування ферментів. По-третє, різні роди ретровірусів ВРХ відрізняються

Рис. 13. Вторинна структура, яка може утворюватися інвертованими повторами у фрагменті гена *vif* вірусу імунodefіциту ВРХ. Комплементарні послідовності підкреслено. (А) Два інвертованих повтори довжиною 22 і 26 нуклеотидів. Вертикальні лінії вказують на їх центри симетрії, а стрілки – на їхню орієнтацію. (Б) Шпилькові структури, що відповідають наведеним вище інвертованим повторам.

між собою не тільки якісним характером розподілу шпильок, а й їхніми кількісними параметрами. Основними сайтами локалізації шпильок у геномі ВЛ ВРХ, що належить до роду дельтаретровірусів, є гени *gag* і *pol*, у той час як у геномі ВІ ВРХ, який є представником роду лентівірусів, шпильки розподілені рівномірно по всьому геному та є присутніми у кодуючих і регуляторних генах. У геномі ВІ ВРХ містяться три термодинамічно стабільних шпильки з довжиною петлі до 6 н., в той час як довжина петель шпильок у геномі ВЛ ВРХ становить не менше 17 н. Зазначимо також наявність значно високостабільнішої шпильки в області 5'-LTR для ВІ ВРХ на відміну від шпильки у геномі ВЛ ВРХ. Наведені факти свідчать про можливість використання розподілу інвертованих повторів для структурної диференціації вірусів.

Рис. 14. Фізична карта геному вірусу імунodefіциту ВРХ з наведеними позиціями відомих генів. Стрілками показано позиції потенційних триплексів, утворених дзеркально-симетричними поліпуриновими/поліпіримідиновими послідовностями (внизу), та шпилькових структур (наверху). – недосконалі шпильки з вільною енергією менше -10 ккал/моль та -15 ккал/моль відповідно. – досконалі шпильки з вільною енергією менше -10 ккал/моль. * - вказано позиції шпильок, розмір петлі яких не перевищує 6 нуклеотидів.

Проведене порівняння діаграм розподілу триплексів (які є одним з ланцюгів сигнальних механізмів функціонування геному) для двох ізолятів ВІ ВРХ показало, що сім з дев'яти потенційних триплексів є консервативними структурними мотивами з ідентичними сайтами локалізації в геномі обох ізолятів ВІ ВРХ. В той же час позиції та послідовності двох інших триплексів незначно відрізняються (обидва ці триплекси локалізовано в гені *pol*). Послідовність та вторинна структура двох знайдених у геномі ВІ ВРХ триплексів наведені на рис. 15. З'єднання стебла одного триплекса з іншим сусіднім триплексом може бути гнучким в

Рис. 15. Структура двох потрійних спіралей (триплексів) для фрагмента провірусної ДНК вірусу імунodefіциту ВРХ, які відповідають положенню 5464-5488 гена *vif* провірусної ДНК ВІ ВРХ. Стрілки вказують на потрійні спіралі. У прямокутниках та підкреслено дзеркально-симетричні повтори “+”-нитки провірусної ДНК ВІ ВРХ, які утворюють два триплекси. Маленькими прямокутниками показано взаємодію третього ланцюга триплекса з фрагментом дволанцюгової ДНК за рахунок Хугстинівського зв'язування. Вставка (А) – модель подвійного триплекса, що пропонується. Вставка (Б) – модель триплекса, яка є неможливою через стеричні обмеження.

залежності від довжини лінкерного дуплекса між ними. Для подвійного триплекса, знайденого у геномі ВІ ВРХ, довжина лінкера становить 2 п.н. Тому у даному випадку можливе формування тільки структури, модель якої показана на вставці А рис. 15. В той же час стеричні обмеження (вставка Б рис. 15) унеможливають утворення двома триплексами П-подібної структури, модель якої запропоновано в роботі (Kato M. et al., 2002).

З усіх проаналізованих потенційних триплексів в провірусній ДНК досліджуваних ретровірусів тільки один фрагмент (CCCCCCTTATGACCCCCC, 740-759, *gag* ВЛ ВРХ) може

брати участь в утворенні хрестоподібної структури. Дані щодо можливості тригерного переключення фрагмента провірусної ДНК ВЛ ВРХ з конформації канонічної подвійної спіралі до конформації триплекса або конформації хрестоподібної структури вказують на особливу роль зазначеного фрагмента в геномній структурі ВЛ ВРХ. Крім того, привертає увагу відсутність досконалих потенційних триплексів в гені *env* обох ретровірусів ВРХ. З одного боку, це підтверджує, що ген *env* є найваріабельнішим з відомих генів ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ, а з іншого, надає додаткову інформацію для конструювання праймерів при створенні молекулярно-генетичних тест-систем для детекції і типування ретровірусів ВРХ.

Послідовність та вторинна структура одного із знайдених у геномі ВЛ ВРХ потенційних триплексів наведені на рис. 16.

Рис. 16. Структура міжланцюгового триплекса для фрагмента провірусної ДНК вірусу лейкозу ВРХ. Стрілки вказують на потрійну спіраль. Підкреслені фрагменти послідовності “–”-нитки провірусної ДНК ВЛ ВРХ вказують на два симетричних повтори, які беруть участь в утворенні триплекса. Маленькими прямокутниками показано взаємодію третього ланцюга триплекса з фрагментом дволанцюгової ДНК за рахунок Хугстинівського зв’язування. На вставці наведено модель даного триплекса.

На основі визначених потенційних шпильок у геномі вірусу лейкозу ВРХ побудована діаграма їх розподілу на фізичній карті геному ВЛ ВРХ (рис. 17). Довжина шпильок в геномі ВЛ ВРХ варіює від 101 до 29 нуклеотидів, а вільна енергія – від -14,6 ккал/моль до -10,1 ккал/моль. Переважна більшість визначених шпилькових структур на фізичній карті ВЛ ВРХ (5 шпильок із 7) локалізована в області генів *gag* (3 шпильки) та *pol* (2 шпильки). Візуалізація за допомогою атомно-силової мікроскопії двох шпильок у складі хрестоподібної структури у послідовності плазмиди рUC8, яку використовували в якості моделі, підтвердила можливість існування шпилькових структур та показала, що серед декількох паліндромів в суперспіральній ДНК рUC8 в умовах *in vitro* тільки один реалізує хрестоподібну структуру, термодинамічно найстабільнішу.

Знання вторинної структури РНК є важливим з ряду причин, зокрема, для розуміння співвідношення структура-функція та наступної розробки терапевтичних олігонуклеотидних засобів. Відомо, що інгібування синтезу білків патогена може здійснюватися шляхом декількох механізмів: інгібування трансляції мРНК, інгібування транскрипції відповідного гена. В останньому варіанті блокування транскрипції гена може здійснюватися шляхом утворення триплексів на молекулі ДНК (Goni J. et al., 2004).

У геномі ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ знайдено 5 та 10 фрагментів, відповідно, які можуть утворювати потрійні спіралі. Встановлення розподілу потенційних триплексів в геномі ретровірусів тварин є одним з етапів на шляху розуміння основних компонентів сигнального механізму функціонування геному віріонів. Подальші фундаментальні дослідження на рівні поодиноких молекул та клітин дозволяють відповісти на численні питання стосовно ролі, функцій та взаємодії зазначених міжланцюгових триплексів з ключовими молекулами. Моделювання вторинної структури з наступною побудовою геномних карт також можна використовувати для структурної диференціації вірусів та, можливо, бактерій на основі

Рис. 17. Фізична карта геному вірусу лейкозу ВРХ з наведеними позиціями відомих генів. Стрілками показано позиції потенційних триплексів, утворених дзеркально-симетричними поліпуриновими/поліпіримідиновими послідовностями, та шпилькових структур. – досконалі та недосконалі шпильки з вільною енергією менше -10 ккал/ моль.

локалізації шпилькових структур та триплексів. Крім того, моделювання потенційних вторинних структур у геномі різних мікроорганізмів, у тому числі патогенів людини та тварин, може сприяти створенню баз даних неканонічних структур, які дозволять проводити порівняння геномів на рівні вторинних структур.

Родо- та видоспецифічна детекція протеїв. Проблема диференційної детекції ентеробактерій шляхом ПЛР та заснованих на ній методів полягає в тому, що багато хромосомних маркерів різних видів родини *Enterobacteriaceae* мають високий ступінь подібності. Гени 16S рРНК, 23S рРНК, гірази (*gyrA* та *gyrB*), РНК-полімерази (*rpoA* та *rpoB*), кластер генів, що кодують сечовину (*ureA-ureG*, *ureR*), які часто використовують для генотипування бактерій та філогенетичного аналізу, у багатьох випадках проявляють недостатній поліморфізм для диференціації близькоспоріднених видів. Враховуючи це, у даній роботі розроблено набір родоспецифічних праймерів для ПЛР-детекції протеїв (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. hauseri* та *P. penneri*), а також два набори праймерів для видоспецифічної детекції *P. mirabilis* та *P. vulgaris* (які є одними із збудників інфекційних захворювань сечостатевої системи людини, що часто зустрічаються, а також викликають септичні ураження різних частин тіла). ПЛР з родоспецифічними праймерами дає можливість ампліфікувати фрагмент гена *gyrB* хромосомної ДНК бактерій роду *Proteus*, а мультиплексна ПЛР з наборами видоспецифічних праймерів – фрагмент гена 16S рРНК хромосомної ДНК *P. mirabilis* та фрагмент гена β -лактамази хромосомної ДНК *P. vulgaris*, які мають різну довжину (рис. 18).

Рис. 18. Видоспецифічна детекція *Proteus vulgaris* після ампліфікації фрагмента ДНК з праймерами Pr4-Pr5 та електрофорезу в 2 % агарозному гелі. М – 100 п.н. маркер молекулярної маси; 1 – негативний контроль ампліфікації; 2, 4 – продукт ампліфікації довжиною 263 п.н., який фланкують комплементарні фрагменту гена β -лактамази праймери Pr4-Pr5, для клінічного ізоляту та лабораторного штаму ATCC 13315 *P. vulgaris* відповідно; 3 – ДНК із клінічного ізоляту *P. mirabilis*.

ПЛР з розробленими видоспецифічними праймерами, тестованими на лабораторних та клінічних штаммах *P. mirabilis* та *P. vulgaris*, може бути використана для диференційної детекції зазначених широко розповсюджених патогенів сечового тракту людини. Зазначимо, що при проведенні ПЛР у реальному часі з набором праймерів Pr4-Pr5 з геномною ДНК *P. vulgaris* вистачає 28 циклів за $T_{\text{відп}} = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 19) для детекції амплікона. В той же час ПЛР для ДНК-матриці, екстрагованої з клінічно значимих ентеробактерій *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium* та *Pseud. putida*, за температури відпалу $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ та кількості циклів понад 45 не призводила до будь-якої ампліфікації, що підтверджує видоспецифічність праймерів Pr4-Pr5.

Рис. 19. Залежність кількості циклів ампліфікації від температури відпалу для проведення ПЛР у реальному часі для видоспецифічної детекції *P. vulgaris*. Визначення необхідної кількості циклів проведено для 1 нг геномної ДНК *P. vulgaris*, що використовували як матрицю.

Маркери для видоспецифічної детекції бацил групи *Bacillus cereus*. Диференціація *B. anthracis* від філогенетично близьких видів *B. cereus* та *B. thuringiensis* на основі хромосомних маркерів залишається актуальною. Недавно показано, що горизонтальний переніс плазмід драматично змінює фенотипові властивості патогена (Helgason E. et al., 2000), а протягом останніх років відкриті ізоляти *B. cereus*, що містять обидві плазмиди рХО1 та рХО2, наявність яких визначає вірулентні властивості *B. anthracis* (Kolsto A. et al., 2009). Тому детекція патогенних штамів *B. anthracis* тільки на основі визначення обох плазмід рХО1 та рХО2 може призводити до хибнопозитивних результатів аналізу. У даному фрагменті роботи на основі комп'ютерного аналізу генів хромосомної ДНК близькоспоріднених видів *B. anthracis*, *B. cereus*,

B. thuringiensis, *B. weihenstephanensis* та ін. визначені маркери для їхньої диференціації та розроблено системи праймерів для видоспецифічної детекції *B. anthracis*, *B. cereus* та *B. thuringiensis* за допомогою ПЛР. Також створено набори праймерів, які дозволяють диференціювати штами *B. anthracis* з різним профілем плазмід, що визначають патогенні властивості штамів.

При визначенні маркерів на першому етапі нами проаналізовано фрагменти геномної ДНК понад 300 ізолятів *B. anthracis*, *B. cereus* та *B. thuringiensis* з бази даних GenBank. Послідовності генів *rpoB* (кодує β -субодиницю РНК-полімерази), *gyrB* (кодує β -субодиницю гірази), *ssp* (кодує низькомолекулярний кислоторозчинний протеїн) та транскрипційного регулятора *plcR* – потенційних хромосомних маркерів для видоспецифічної детекції бактерій групи *B. cereus* – були вибрані для подальшого аналізу. З наведеного фрагмента множинного вирівнювання для гена *rpoB* хромосомної ДНК 29 штамів *B. anthracis*, *B. thuringiensis* та *B. cereus* (рис. 20) видно,

Рис. 20. Фрагмент множинного вирівнювання гена *rpoB* ізолятів *Bacillus anthracis*, *B. cereus* та *B. thuringiensis* із бази даних GenBank. Нуклеотиди, які не збігаються з нуклеотидами послідовності ізоляту *B. cereus* AF205337, показано маленькими буквами. Наведено номери, що відповідають номерам ізолятів у базі даних. AE017024 – ізолят *B. anthracis* з повністю секвенованим геномом. BanrpoB2 – зворотний праймер для диференціації *B. anthracis*. Підкреслено сайт рестрикції для ендонуклеази рестрикції BamHI та 3'-хитний нуклеотид, що забезпечує специфічність праймера.

що ген *rpoB* можна використовувати для видоспецифічної детекції *B. anthracis* за рахунок нуклеотида, що не збігається, на 3'-кінці праймера у порівнянні з ізолятами *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Враховуючи це, нами на основі комп'ютерного та термодинамічного аналізу було створено набір праймерів BanrpoB-BanrpoB2, комплементарних фрагменту гена *rpoB*, що дозволяє диференціювати *B. anthracis* від близькоспоріднених штамів *B. thuringiensis* та *B. cereus*.

Проведений аналіз фрагментів гена *rpoB* підтвердив відомі літературні дані, що стосуються різноманіття його нуклеотидної послідовності. Наші дані збігаються з результатами роботи (Ко К. et al., 2004), в якій визначено, що кількість варіабельних сайтів для гена *rpoB* становить лише 7,86 %.

В той же час ізоляти *B. thuringiensis* доволі складно диференціювати на основі гена *rpoB*, оскільки вони мають надзвичайно високий ступінь подібності нуклеотидної послідовності з ізолятами *B. cereus*. Більше того, деякі ізоляти *B. thuringiensis* генетично є ближчими до *B. cereus*, ніж до інших ізолятів *B. thuringiensis*. Про суперечливість таксономічної класифікації представників *B. cereus* та *B. thuringiensis* свідчить побудоване філогенетичне дерево (рис. 21).

Для диференціації патогенних та непатогенних штамів *B. anthracis* створений набір видоспецифічних праймерів був доповнений праймерами, які дозволяють диференціювати штами *B. anthracis* з різним профілем плазмід, що визначають патогенні властивості штамів, тобто ізоляти *B. anthracis*, які містять обидві плазміді ($pXO1^+$, $pXO2^+$), та штами, у яких відсутні одна ($pXO1^+$, $pXO2^-$ та $pXO1^-$, $pXO2^+$) або обидві плазміді ($pXO1^-$, $pXO2^-$).

Достатньо складним і масштабним етапом роботи були дослідження з характеристизації термодинамічно стабільних досконалих та недосконалих шпилькових структур, що утворюються інвертованими повторами та можуть виникати в РНК, які транскрибуються з плазмід $pXO1$ та $pXO2$ *B. anthracis*. Визначення вторинної структури РНК, а також неканонічних структур ДНК є надзвичайно важливим для покращення нашого розуміння їхніх біологічних функцій (Fratczak A. et al., 2009). Інтерес до можливості утворення таких структур виник у зв'язку з тим, що вони є одним із факторів, що регулює стабільність мРНК

мікроорганізмів (Grunberg-Manago M., 1999; Deutscher M. et al., 2001), а також можуть виступати у якості РНК-термометрів, які змінюють свою конформацію дуплекса у відповідь на зміну температури, що знаходиться під постійним контролем дуплексів. Незважаючи на важливі біологічні функції плазмід, інформація про розподіл потенційних шпильок у їхніх послідовностях взагалі та у геномі *B. anthracis* зокрема у доступній літературі відсутня.

Раніше для суперспіральных ДНК, послідовності яких містять інвертовані повтори, було встановлено, що за фізіологічних умов можливе утворення шпильок як фрагментів хрестоподібної структури з довжиною стебла не менше семи п.н. та петлею, розмір якої не перевищує 4-5 нуклеотидів (Lilley D., 1980; Sinden R. et al., 1984; Lyamichev V. et al., 1984). Виходячи з цих параметрів, в роботі визначено термодинамічно стабільні досконалі та недосконалі шпилькові структури у послідовностях РНК, що транскрибуються з плазмід рХО1 та рХО2 *B. anthracis*.

Встановлено, що РНК, яка транскрибується з плазмиди рХО1, може містити 67 шпилькових структур з петлею, розмір якої не перевищує п'ять нуклеотидів (рис. 22). З них 11 шпильок характеризуються вільною енергією ΔG менше -20 ккал/моль. Цікаво, що в РНК, яка транскрибується з плазмиди рХО1, виявлено чотири досконалі інвертовані повтори, що можуть утворювати шпильки з високим значенням вільної енергії (ΔG становить менше -20 ккал/моль) та петлею 8-13 н. На нашу думку, наявність таких досконалих інвертованих повторів з високим значенням енергії потенційної шпильки свідчить про можливість існування *in vivo* шпильок з петлею, розмір яких становить 8-13 н.

РНК, яка транскрибується з плазмиди рХО1, містить 17 довгих паліндромів довжиною 45-66 нуклеотидів з вільною енергією шпильки ΔG від -20,7 ккал/моль до -30,6 ккал/моль та 10 коротких паліндромів довжиною 31-43 нуклеотиди з вільною енергією шпильки ΔG від -20,5

Рис. 21. Філогенетичний аналіз штамів *Bacillus anthracis*, *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Філограма побудована на основі фрагмента гена *rpoB* хромосомної ДНК довжиною 777 п.н. Цифрами показано статистичну вірогідність порядку розгалуження (у %), визначену за допомогою бутстреп-аналізу. ? – ізоляти для можливої рекласифікації.

ккал/моль до -30,6 ккал/моль. Загальне число потенційних шпильок становить 135, що приблизно дорівнює числу відомих рамок зчитування (143) для рХО1 (Okinaka R. et al., 1999). Зазначимо, що переважна більшість шпилькових структур на фізичній карті плазмиди рХО1 локалізована в області регуляторних генів або в елементах з невизначеною функцією. Це підтверджує відомі літературні дані щодо наявності шпилькових структур у регуляторних фрагментах, зокрема у багатьох термінаторах транскрипції (Kashlev M. et al., 2002). Аналізуючи експериментальні дані з реплікації мініплазмиди рХО1 (Pomerantsev A. et al., 2009), нами знайдено, що шість визначених потенційних шпильок локалізовано в температурно-чутливому фрагменті цієї мініплазмиди (показано двома стрілками на рис. 22). Більше того, делеція відкритої рамки зчитування ORF16, яка містить інвертований повтор, що може утворити

Рис. 22. Фізична карта плазмиди рХО1 *Bacillus anthracis* (Okinaka R. et al., 1999). Наведено позиції відомих генів токсинів, елементів IS1623, а також очікувані позиції 143 відкритих рамок зчитування (показано цифрами). Гени, що кодують: *lef* – ендопептидазу летального фактора, *суа* – чутливу до калмодуліна аденилциклазу, *pag A* – захисний антиген, *atx A* – позитивний трансрегулятор експресії токсину виразки, *pag R* – транскрипційний репресор. Стрілками показано позиції визначених термодинамічно стабільних досконалих та недосконалих шпилькових структур, що можуть утворюватися в молекулах РНК. Цифрами від 1 до 9 показано потенційні шпилькові структури, 6 з яких відповідають температурно-чутливому мотиву мініплазмиди рХО1, ідентифікованому в роботі (Pomerantsev A. et al., 2009); шпилька 5 може бути РНК-

термометром. * – відповідає шпильковим структурам, довжина петлі яких перевищує 12 нуклеотидів. Шпильки з вільною енергією менше: 1 – -10 ккал/моль; 2 – -15 ккал/моль; 3 – -20 ккал/моль; 4 – -25 ккал/моль; 5 – -30 ккал/моль.

стабільну шпильку з вільною енергією більше -10 ккал/моль (показано на рис. 22 стрілкою), веде до того, що клоновані в *E. coli* мініплазміди рХО1 реплікуються тільки за $T = 30^{\circ}\text{C}$ і втрачають можливість до реплікації за $T = 37^{\circ}\text{C}$. На наш погляд, цей нетривіальний факт може служити доказом того, що зазначена шпилька виконує роль РНК-термометра при реплікації мініплазмиди.

На відміну від РНК, що транскрибується з плазмиди рХО1, молекули РНК, які транскрибуються з ДНК-матриці рХО2, не містять жодного довгого паліндрома з потенціалом утворення шпильки з петлею до п'яти нуклеотидів, а також жодного короткого паліндрома з вільною енергією шпильки ΔG менше -20 ккал/моль. Досконалі та недосконалі інвертовані повтори є високостабільними (значення вільної енергії стебла шпильки варіює в діапазоні -10 – -29,8 ккал/моль) генетичними елементами як для плазмиди рХО1, так і для плазмиди рХО2. Можна припустити, що шпилькові структури локалізовані на молекулах РНК, що транскрибуються з плазмид рХО1 та рХО2, не випадково, а розташовані в областях термінаторів транскрипції, ініціації реплікації, поряд з “гарячими” точками рекомбінації подібно до довгих гомопуринових трактів, що мають потенціал для утворення триплексів (Katayama T. et al., 2007), а також, що одна з біологічних функцій даних шпильок полягає в захисті РНК-транскриптів плазмід, що обумовлюють вірулентність бацил, від деградууючої активності різних факторів.

Структура шпильок, яку визначають за допомогою комп'ютерного аналізу, істотним чином залежить від алгоритму пошуку, що використовують, а також від параметрів шпильок. Тому ми зосередили головну увагу на пошуку термодинамічно стабільних досконалих та недосконалих шпилькових структур, тобто таких, які реально спостерігали у попередніх експериментах. Виходячи з цього, в роботі не розглядали (якщо не вказане інше) недосконалі повтори, у яких було більше двох пар неспарених нуклеотидів, а розмір петлі перевищував 6 нуклеотидів.

Для перевірки надійності алгоритму визначення вторинних структур проведено моделювання вторинної структури у фрагменті мРНК *Saccharomyces cerevisiae*. Для даного фрагмента довжиною 74 п.н. з залученням ЯМР-даних у роботі (Turner D. et al., 2006) було передбачено три варіанти вторинної структури, кожний з яких характеризується 19 канонічними парами нуклеотидів. Проведене нами моделювання вторинної структури вказаного фрагмента підтверджує також можливість утворення 19 канонічних п.н. Таким чином, дане тестування показало, що результати визначення вторинних структур добре узгоджуються з літературними даними, і, отже, методику передбачення потенційних шпилькових структур можна вважати надійною.

ВИСНОВКИ

У дисертації дано нове вирішення наукової проблеми молекулярної біотехнології – підвищення ефективності методів молекулярної детекції та типування соціально значущих інфекційних збудників вірусної і бактеріальної природи та пошуку структурно-функціональних маркерів у їхньому геномі. На основі порівняння даних, отриманих за допомогою різних модифікацій полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), комп'ютерного аналізу, показано, що технології детекції точкових мутацій за допомогою ПЛР з використанням праймера з LNA-мономерами, додаткового блокуючого праймера дозволяють ефективно і швидко визначати тип точкових мутацій та детектувати лікарсько-стійкі та чутливі патогени.

1. Створено молекулярну технологію диференціації мікобактерій туберкульозу дикого та мутантного типів. Розроблені молекулярно-генетичні набори з використанням LNA-модифікованих праймерів дозволяють за допомогою алель-специфічної ПЛР диференціювати чутливі та резистентні мікобактерії туберкульозу до протитуберкульозного препарату першого ряду ізоніазиду, а саме постановкою однієї реакції встановити наявність будь-якого з шести можливих варіантів точкових мутацій у кодоні 315 гена *katG*, асоційованих з резистентністю до даного препарату.

2. Створено технологію визначення варіантів точкових мутацій в кодоні 315 гена *katG* мікобактерій туберкульозу на основі алель-специфічної ПЛР з додатковим блокуючим праймером. Два набори праймерів, кожний з яких містить додатковий конкурентний блокуючий праймер з 3'-термінальною фосфатною групою, дозволяють виявляти точкові мутації AGC → ACC, AGC → AGA та AGC → ACA, що найчастіше зустрічаються.

3. Розроблено п'ять наборів праймерів для диференціації близькоспоріднених мікобактерій туберкульозного комплексу *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. bovis* та *M. caprae*. Перевірка розроблених праймерів з використанням ДНК, екстрагованої з штамів *M. tuberculosis*, *M. bovis* та *M. microti*, показала, що ПЛР з праймерами, які мають хитний 3'-кінцевий нуклеотид (комплементарний кінцевому нуклеотиду одноланцюгової ДНК-мішені тільки певного виду мікобактерій), може бути використана для генотипування МТК при коректному виборі температури відпаалу праймерів.

4. Визначено молекулярно-генетичні маркери та розроблено систему родоспецифічних праймерів для детекції протеїв – *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. hauseri* та *P. penneri*, – а також два набори праймерів для видоспецифічної детекції *P. vulgaris* та *P. mirabilis*, широко розповсюджених патогенів сечового тракту людини. Створено набори праймерів для генотипування шести видів харчових патогенів: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. welshimeri*.

5. Проведено типування вірусу лейкозу великої рогатої худоби, циркулюючого на території України, та за результатами ПДРФ-аналізу і секвенування встановлено належність українського ізоляту ВЛ ВРХ до австралійського підвиду – одного з трьох відомих підвидів цього патогена.

6. Розроблено систему праймерів для детекції провірусної ДНК вірусу імунodefіциту великої рогатої худоби. Амплікон очікуваного розміру був детектований для трансформованої клітинної лінії тестикулів ВРХ, що містить провірусну ДНК ВІ ВРХ, плазміди з клонованою провірусною ДНК ізоляту R29 ВІ ВРХ, а також для ДНК, екстрагованої з лімфоцитів периферійної крові серопозитивних овець та корів, що були експериментально інфіковані ВІ ВРХ.

7. Створено карти локалізації потенційних досконалих та недосконалих шпилькових та хрестоподібних структур в геномній РНК та провірусній ДНК вірусів лейкозу та імунodefіциту великої рогатої худоби, а також для низки коронавірусів людини (вірусу тяжкого гострого респіраторного синдрому) та тварин (вірусів гепатиту миші, епідемічної діареї свині, трансмісивного гастроентериту, бичачого коронавірусу).

8. Визначено розподіл та запропоновано моделі потенційних внутрішньомолекулярних триплексів, утворених поліпуриновими/поліпіримідиновими дзеркально-симетричними повторами у провірусній ДНК ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ, представлено карти геному вірусів з локалізованими триплексами. Встановлено, що розподіли шпильок та триплексів у геномах ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ відрізняються якісно та кількісно. Запропоновано використовувати карти локалізації шпилькових структур та триплексів для структурної диференціації геномів бактерій та вірусів.

9. Розроблено набори праймерів для видоспецифічної детекції бактерій *Bacillus anthracis*, *B. cereus* та *B. thuringiensis* та диференціації штамів *B. anthracis* з різним профілем плазмід, що визначають патогенні властивості штамів.

10. Показано, що досконалі та недосконалі шпилькові структури є високостабільними (значення вільної енергії стебла шпильки варіює в діапазоні -10 – -29,8 ккал/моль) генетичними елементами для молекул РНК, що транскрибуються з плазмід рХО1 та рХО2 збудника сибірської виразки *B. anthracis*. Представлено карти плазмід рХО1 та рХО2 з локалізованими шпильковими структурами. Потенційні шпильки локалізовані в області регуляторних генів, елементах з невизначеною функцією або всередині температурно-чутливого мотиву, де вони можуть виконувати роль РНК-термометрів.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Лиманский А. П. Видоспецифическая детекция ДНК *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* посредством полимеразной цепной реакции / А. П. Лиманский, В. В. Минухин, О. Ю. Лиманская, Н. В. Павленко, М. М. Мишина, А. Я. Цыганенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 3. – С. 33–39.
2. Лиманская О. Детекция провирусной ДНК вируса иммунодефицита крупного рогатого скота посредством полимеразной цепной реакции / О. Лиманская, М. Rola, L. Bicka, J. Kuzmak, А. Лиманский // Вопросы вирусологии. – 2005. – № 2. – С. 38–43.
3. Лиманский А. П. Компьютерный анализ инвертированных повторов в геноме микобактерий туберкулеза / А. П. Лиманский, О. Ю. Лиманская, Ю. Л. Волянский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2004. – № 5. – С. 48–52.
4. Лиманский А. П. Типирование вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего в Украине / А. П. Лиманский, L. Geue, О. Ю. Лиманская, D. Beier // Вопросы вирусологии. – 2004. – № 1. – С. 39–44.
5. Limansky A. P. Comparison of primer sets for detection of bovine leukemia virus by polymerase chain reaction / A. P. Limansky, О. Yu. Limanskaya // Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy (Poland). – 2002. – Vol. 46, № 1. – P. 27–36.
6. Лиманська О. Ю. Аналіз наборів праймерів для ПЛР-детекції провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби та вірусу імунодефіциту людини за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / О. Ю. Лиманська, О. П. Лиманський // Біополімери і клітина. – 2002. – Т. 18, № 2. – С. 124–130.
7. Limanskii A. The methods of molecular genetics as the basis for the programs of bovine leukosis eradication / A. Limanskii, О. Limanskaya // Russian J. of Biotechnology. – 2001. – № 3. – P. 187–193.
Лиманский А. П. Молекулярно-генетические методы – основа программ по искоренению лейкоза крупного рогатого скота / А. П. Лиманский, О. Ю. Лиманская // Биотехнология. – 2001. – № 3. – С. 40–50.
8. Лиманский А. П. Разработка и апробация метода полимеразной цепной реакции для детекции возбудителя менингококковой инфекции / А. П. Лиманский, О. Ю. Лиманская, В. И. Белозерский, Е. Н. Тимченко, С. И. Похил // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 4. – С. 44–47.
9. Красовский В. В. Разработка и апробация метода полимеразной цепной реакции для детекции возбудителя листериозной инфекции / В. В. Красовский, С. И. Похил, А. П. Лиманский, О. Ю. Лиманская, Е. Н. Тимченко // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 6. – С. 37–41.

10. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини / [Б. Т. Стегній, А. П. Герілович, О. Ю. Лиманська, В. І. Болотін, А. В. Скрипник, С. А. Сапко, Р. Ю. Анічин]; під заг. ред. Б. Т. Стегнія. – [1-е вид.] – Харків, 2006. – 108 с.
11. Лиманська О. Ю. Ампліфікація провірусної ДНК вірусу імунodefіциту великої рогатої худоби у експериментально інфікованих тварин / О. Ю. Лиманська, М. Rola, L. Bicka, J. Kuzmak, Ю. Л. Волянський, Н. Б. Пугач, С. В. Новіков, О. П. Лиманський // Мікробіологічний журнал. – 2007. – Т. 69, № 1. – С. 52–60.
12. Лиманський О. П. Родо- та видоспецифічна детекція протеїв / О. П. Лиманський, О. Ю. Лиманська // Біологический вестник. – 2006. – Т. 10, № 1. – С. 96–101.
13. Лиманская О. Ю. Маркеры для видоспецифической детекции бацилл группы *Bacillus cereus* / О. Ю. Лиманская, А. П. Лиманский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 3. – С. 20–26.
14. Limanskaya O. Yu. Imaging of T7 RNA polymerase elongation complexes by atomic force microscopy / O. Yu. Limanskaya, A. P. Limanskii // Molecular Biology. – 2008. – Vol. 42, № 3. – P. 469–477. (<http://dx.doi.org/10.1134/S0026893308030175>)
Лиманская О. Ю. Визуализация элонгационных комплексов Т7 РНК-полимеразы с помощью атомно-силовой микроскопии / О. Ю. Лиманская, А. П. Лиманский // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42, № 3. – С. 533–542.
15. Лиманська О. Ю. Розподіл шпилькових структур у плазмідах збудника сибірської виразки / О. Ю. Лиманська, О. П. Лиманський // Біополімери і клітина. – 2008. – Т. 24, № 6. – С. 463–469.
16. Limanskaya O. Imaging compaction of single supercoiled DNA molecules by atomic force microscopy / O. Limanskaya, A. Limanskii // General Physiology and Biophysics. – 2008. – Vol. 27, № 4. – P. 322–337.
17. Лиманська О. Ю. Поліпуринові/поліпиримідинові послідовності з потенціалом утворення триплексів в провірусній ДНК ретровірусів великої рогатої худоби / О. Ю. Лиманська // Цитология и генетика. – 2010. – Т. 44, № 1. – С. 10–18.
18. Лиманська О. Ю. Біоінформатичний аналіз інвертованих повторів геному коронавірусів / О. Ю. Лиманська // Біополімери і клітина. – 2009. – Т. 25, № 4. – С. 307–314.
19. Лиманская О. Ю. Распределение потенциальных шпильчатых структур в геноме ретровирусов крупного рогатого скота / О. Ю. Лиманская, А. П. Лиманский // Вопросы вирусологии. – 2009. – Т. 54, № 4. – С. 27–32.
20. Лиманська О. Ю. Визначення статі ембріонів та виявлення вірусу лейкозу ВРХ за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / О. Ю. Лиманська, О. П. Лиманський // Вісник аграрної науки. – 2001. – № 3. – С. 34–39.
21. Лиманская О. Ю. Видоспецифическая детекция микобактерий туберкулезного комплекса / О. Ю. Лиманская // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – № 10. – С. 49–56.
22. Лиманская О. Ю. Детекция изолятов дикого типа и резистентных к изониазиду микобактерий туберкулеза / О. Ю. Лиманская, Т. Н. Мухина, В. Н. Степаншина, И. Г. Шемякин, В. В. Минухин, А. П. Лиманский // Туберкулез и болезни легких. – 2010. – № 9. – С. 45–51.
23. Limanskaya O. Yu. Identification of wild type *Mycobacterium tuberculosis* isolates and point mutations associated with isoniazid resistance / O. Yu. Limanskaya, T. N. Mukhina, V. N. Stepanshina, I. G. Shemyakin, X. Wu, J. Zhang, T. V. Fesenko, V. A. Pokrovskiy, A. P. Limanskii // Molecular Biology. – 2010. – Vol. 44, № 4. – P. 559–567. (<http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1134/S0026893310040096>)
Лиманская О. Ю. Детекция изолятов дикого типа и точечных мутаций в геноме устойчивых к изониазиду микобактерий туберкулеза / О. Ю. Лиманская, Т. Н. Мухина, В. Н.

- Степаншина, И. Г. Шемякин, X. Wu, J. Zhang, Т. В. Фесенко, В. А. Покровский, А. П. Лиманский // Молекулярная биология. – 2010. – Т. 44, № 4. – С. 635–645.
24. Лиманський О. П. Набір праймерів для детекції *Mycobacterium tuberculosis* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / О. П. Лиманський, П. І. Потейко, А. Д. Ляпунова, О. М. Тимченко, О. Ю. Лиманська, Н. П. Волянська // Український біохімічний журнал. – 2002. – Т. 74, № 46. – С. 186.
25. Лиманский А. П. Анализ высококонсервативных вставочных элементов IS6110 генома *Mycobacterium tuberculosis* / А. П. Лиманский, Н. П. Волянская, О. Ю. Лиманская, П. И. Потейко, А. Д. Ляпунова, Т. О. Пасечник // Буковинський медичний вісник. – 2002. – Т. 6, № 3. – С. 174–177.
26. Деклараційний патент № 66255 А Україна, МПК С 12 Q 1/04, 1/68. Спосіб детекції *Proteus vulgaris* / А. Я. Циганенко, О. Ю. Лиманська, О. П. Лиманський, М. М. Мішина, В. В. Мінухін; Харківський державний медичний університет. – № 2003098322; заявл. 09.09.03; опубл. 15.04.04, Бюл. № 4. – 3 с.
27. Деклараційний патент № 66291 А Україна, МПК С 12 Q 1/04, 1/68. Спосіб детекції вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби / О. П. Лиманський, О. Ю. Лиманська, А. Ю. Волянський, А. І. Доброскок, С. В. Новіков, В. А. Манолов, Н. П. Волянська; Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України. – № 2003109196; заявл. 13.10.03; опубл. 15.04.04, Бюл. № 4. – 3 с.
28. Деклараційний патент № 40310 А Україна, МПК С 12 Q 1/04, С 12 Q 1/68, G 01 N 33/569. Спосіб детекції лістерій *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* / О. П. Лиманський, А. Ю. Волянський, О. Ю. Лиманська; Харківський науково-дослідний інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України. – № 2000126876; заявл. 01.12.00; опубл. 16.07.01, Бюл. № 6. – 4 с.
29. Деклараційний патент № 39715 А Україна, МПК С 12 Q 1/04, С 12 Q 1/68, G 01N 33/569. Спосіб типування патогенних і непатогенних лістерій / О. Ю. Лиманська, А. Ю. Волянський, О. П. Лиманський; Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України. – № 2001010093; заявл. 03.01.01; опубл. 15.06.01, Бюл. № 5. – 3 с.
30. Деклараційний патент № 40371 А Україна, МПК С12Q 1/04, С12Q 1/68, G01N 33/569. Спосіб детекції патогенних лістерій / А. Ю. Волянський, О. П. Лиманський, О. Ю. Лиманська; Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України. – № 20000127435; заявл. 22.12.00; опубл. 16.07.01, Бюл. № 6. – 3 с.
31. Спосіб детекції *Proteus vulgaris* та *Proteus mirabilis* : пат. 80264 Україна: МПК С 12 Q 1/04, С 12 Q 1/68, С 12 R 1/37, G 01 N 33/569/ А. Я. Циганенко, О. Ю. Лиманська, О. П. Лиманський, В. В. Мінухін; заявник та власник Харківський державний медичний університет. – № 20040604513; заявл. 10.06.04; опубл. 10.09.07, Бюл. № 14. – 6 с.
32. Деклараційний патент № 34435 Україна, МПК С 12 Q 1/04, 1/68, С 12 N 15/34, С 07 H 21/00. Спосіб диференціації мікобактерій туберкульозного комплексу / О. П. Лиманський, О. Ю. Лиманська, Л. О. Лиманська; ДУ “Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України”. – № u200803341; заявл. 17.03.08; опубл. 11.08.08, Бюл. № 15. – 4 с.
33. Детекция вируса иммунодефицита крупного рогатого скота с помощью полимеразной цепной реакции / О. Лиманская, М. Rola, L. Bicka, J. Kuzmak, Ю. Волянский, А. Волянский, И. Кучма, А. Лиманский // Генодиагностика инфекционных болезней: тез. докл. 5-ой Всерос. научно-практ. конф. (Москва, 19-21 октября 2004 г.). – Москва, 2004. – С. 225–227.
34. Детекция и типирование протеев / О. Лиманская, Ю. Волянский, А. Волянский, И. Кучма, А. Цыганенко, В. Минухин, А. Лиманский // Генодиагностика инфекционных болезней: тез. докл. 5-ой Всерос. научно-практ. конф. (Москва, 19-21 октября 2004 г.). – Москва, 2004. – С. 228–229.

35. Определение подвидовой принадлежности вируса лейкоза крупного рогатого скота / О. Лиманская, L. Geue, D. Beier, A. Волянский, И. Кучма, А. Лиманский // Генодиагностика инфекционных болезней: тез. докл. 5-ой Всерос. научно-практ. конф. (Москва, 19-21 октября 2004 г.). – Москва, 2004. – С. 227–228.
36. Limanskii A. Inverted repeats in microorganisms: comparison of two isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with complete genome and visualization of cruciform structure in plasmid DNA by atomic force microscopy / A. Limanskii, O. Limanskaya // 1st FEMS Congress of European Microbiologists (Ljubljana, June 29 - July 3, 2003): proceeding. – Ljubljana, 2003. – P. 442.
37. Mishina M. Detection of *Proteus mirabilis* DNA by polymerase chain reaction / M. Mishina, O. Limanskaya, V. Minukhin, A. Tsyganenko, A. Limanskii // тез. доп. конф. для молодых науковців, аспірантів та студентів з молекулярної біології і генетики (Київ, 25-27 вересня 2003 р.). – Київ, 2003. – С. 22.
38. Volyanskaya N. Development of molecular PCR based assay for detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex / N. Volyanskaya, A. Limanskii, O. Limanskaya // тез. доп. конф. для молодых науковців, аспірантів та студентів з молекулярної біології і генетики (Київ, 25-27 вересня 2003 р.). – Київ, 2003. – С. 274.
39. Limanskii A. Primer sets for PCR based detection of coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome / A. Limanskii, N. Volyanskaya, O. Limanskaya, Yu. Volyanskii // тез. доп. конф. для молодых науковців, аспірантів та студентів з молекулярної біології і генетики (Київ, 25-27 вересня 2003 р.). – Київ, 2003. – С. 175.
40. Limanskii A. Inverted repeats: computer analysis of microorganisms genome and imaging of cruciform structure in DNA by atomic force microscopy / A. Limanskii, O. Limanskaya // SPIES First International Symp. on Microtechnologies for the New Millennium (Maspalomas, May 19-21, 2003): proceeding. – Maspalomas, 2003. – Vol. 5119. – P. 337–348.
41. Limanskaya O. Analysis of primer sets for provirus DNA detection by polymerase chain reaction of bovine leukemia virus and human immunodeficiency virus / O. Limanskaya, A. Limansky // тез. доп. конф. для молодых науковців, аспірантів та студентів з молекулярної біології і генетики (Київ, 20-22 сентября, 2001 р.). – Київ, 2001. – С. 150.
42. Циганенко А. Я. Молекулярно-генетичний аналіз геному бактерій *Proteus vulgaris* та *Proteus mirabilis* / А. Я. Циганенко, О. Ю. Лиманська, О. П. Лиманський, М. М. Мішина // тез. доп. III міжн. науково-практична конф. “Наука і соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія” (Харків, 21-23 травня 2003 р.). – Харків, 2003. – С. 217.
43. Волянский Ю. Л. Химические и биологические проблемы современного состояния борьбы с международным терроризмом / Ю. Л. Волянский, Н. Ф. Клещев, А. Н. Ситенко, О. Ю. Лиманская, А. П. Лиманский // тр. семинара по инновационным технологиям и техническим средствам для борьбы с терроризмом (Харьков, 4-5 июля 2002 г.). – Харьков, 2002. – С. 45–47.
44. Limanskaya O. Yu. Imaging stretched and compressed DNA molecules / O. Yu. Limanskaya, V. V. Goncharenko, M. V. Goncharenko, A. P. Limanskii // First Int. Symp. “Supramolecular and nanochemistry: toward applications” (Kharkov, August 25 – August 29, 2008): proceeding. – Kharkov, 2008. – P. 211.
45. Limanskaya O. Yu. Visualization of T7 RNA polymerase elongation complexes by atomic force microscopy / O. Yu. Limanskaya, A. P. Limanskii // First Int. Symp. “Supramolecular and nanochemistry: toward applications” (Kharkov, August 25 – August 29, 2008): proceeding. – Kharkov, 2008. – P. 212.
46. Лиманская О. Ю. Детекция чувствительных и устойчивых к изониазиду микобактерий туберкулеза / О. Ю. Лиманская, Т. Н. Мухина, В. Н. Степаншина, И. Г. Шемякин, А. П.

- Лиманский // 10-й Український біохімічний з'їзд (Одеса, 13-17 вересня 2010 р.): – матеріали. – Український біохімічний журнал. – 2010. – Т. 82, № 4 (додаток 2). – С. 271.
47. Лиманська О. Ю. Характеризація праймерів з LNA-мономерами / О. Ю. Лиманська, Т. В. Фесенко, В. О. Покровський, О. П. Лиманський // 10-й Український біохімічний з'їзд (Одеса, 13-17 вересня 2010 р.): – матеріали. – Український біохімічний журнал. – 2010. – Т. 82, № 4 (додаток 2). – С. 272.
48. Лиманская О. Ю. Маркеры для видоспецифической детекции бацилл группы *Bacillus cereus* / О. Ю. Лиманская, А. П. Лиманский // 10-й Український біохімічний з'їзд (Одеса, 13-17 вересня 2010 р.): – матеріали. – Український біохімічний журнал. – 2010. – Т. 82, № 4 (додаток 2). – С. 210–211.
49. Limanskaya O. Detection of the point mutations in the katG gene of isoniazid-resistant mycobacteria tuberculosis / O. Limanskaya, X. Wu, J. Zhang, A. Limanskii // 10-й Український біохімічний з'їзд (Одеса, 13-17 вересня 2010 р.): – матеріали. – Український біохімічний журнал. – 2010. – Т. 82, № 4 (додаток 2). – С. 273.

АНОТАЦІЯ

Лиманська О.Ю. Молекулярні технології в типуванні та детекції патогенів бактеріальної і вірусної природи. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2011.

Представлено результати пошуку структурно-функціональних маркерів та цільових мішеней для молекулярної детекції та типування соціально значущих патогенів. На основі поліморфізму поодиноких нуклеотидів створено молекулярно-генетичні набори, що дозволяють здійснювати диференціацію близькоспоріднених мікобактерій туберкульозного комплексу, розповсюджених патогенів сечового тракту людини *Proteus mirabilis* та *P. vulgaris*, видоспецифічну детекцію бактерій групи *Bacillus cereus sensu lato*. Розроблено технології детекції точкових мутацій за допомогою алель-специфічної ПЛР з використанням праймера з LNA-мономерами, додаткового блокуючого праймера, які дозволяють визначати тип точкових мутацій та чутливість або резистентність мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозного препарату першого ряду ізоніазиду. Проведено типування вірусу лейкозу (ВЛ) великої рогатої худоби (ВРХ), циркулюючого на території України, та за результатами ПДРФ-аналізу і секвенування встановлено належність українського ізоляту ВЛ ВРХ до австралійського підвиду, одного з трьох відомих підвидів цього патогена. Розроблено систему праймерів для детекції провірусної ДНК вірусу імунодефіциту (ВІ) ВРХ. Створено карти локалізації досконалих і недосконалих шпилькових структур та триплексів в геномі ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ, а також в геномі низки коронавірусів людини та тварин. Встановлено, що розподіли шпильок та триплексів у геномах ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ відрізняються якісно та кількісно.

Ключові слова: генотипування, триплекс, шпилькова структура, мікобактерії туберкульозного комплексу, мікобактерія туберкульозу, протей, збудник сибірської виразки, вірус імунодефіциту великої рогатої худоби, одонуклеотидний поліморфізм, замкнена нуклеїнова кислота.

АННОТАЦИЯ

Лиманская О.Ю. Молекулярные технологии в типировании и детекции патогенов бактериальной и вирусной природы. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, 2011.

Представлены результаты поиска структурно-функциональных маркеров и целевых мишеней для молекулярной детекции и типирования социально значимых патогенов.

Создана молекулярная технология дифференциации микобактерий туберкулеза (МТБ) дикого и мутантного типов. Разработанные молекулярно-генетические наборы с использованием LNA-модифицированных праймеров позволяют посредством аллель-специфичной (АС) ПЦР дифференцировать чувствительные и резистентные МТБ к противотуберкулезному препарату первого ряда изониазиду, а именно, постановкой одной реакции определять наличие любого из шести возможных вариантов точечных мутаций в кодоне 315 гена *katG*, ассоциированных с резистентностью к данному препарату.

Разработана технология определения вариантов точечных мутаций в кодоне 315 гена *katG* МТБ на основе аллель-специфичной ПЦР. Два набора праймеров, каждый из которых содержит дополнительный конкурентный блокирующий праймер с 3'-концевой фосфатной группой, позволяют выявлять наиболее часто встречающиеся точечные мутации AGC → ACC, AGC → AGA и AGC → ACA.

Проверка разработанных праймеров с использованием ДНК, экстрагированной из штаммов *M. tuberculosis*, *M. bovis* и *M. microti*, показала, что ПЦР с праймерами, содержащими качающийся 3'-концевой нуклеотид (комплементарный концевому нуклеотиду одноцепочечной ДНК-матрицы только определенного вида микобактерий), может быть использована для генотипирования МТБ при корректном выборе температуры отжига праймеров. Аналогичный подход был использован при разработке наборов праймеров для видоспецифической детекции близкородственных бактерий *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis*, а также для дифференциации штаммов *B. anthracis* с разным профилем плазмид, определяющих патогенность штаммов. Показано, что топологию филогенетического дерева можно использовать в качестве показателя надежности и точности таксономической классификации видов микроорганизмов.

На основе анализа различных локусов генома протеев, широко распространенных патогенов мочевого тракта человека, выбраны маркеры для родо- и видоспецифической детекции протеев (*Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. hauseri* и *P. penneri*). Созданы наборы праймеров, позволяющих осуществлять родоспецифическую детекцию протеев на основе амплификации фрагмента гена *gyrB* хромосомной ДНК. Показано, что в качестве молекулярных маркеров для видовой идентификации *P. vulgaris* и *P. mirabilis* могут быть использованы гены β-лактамазы и 16S рРНК соответственно. Сконструировано два набора видоспецифических праймеров, позволяющих проводить дифференциацию *P. vulgaris* и *P. mirabilis*, и проведено их тестирование на клинических и лабораторных штаммах протеев.

Созданы молекулярно-генетические тест-системы, позволяющие осуществлять посредством гнездовой ПЦР детекцию и генотипирование шести видов патогенных и непатогенных листерий – *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. welshimeri*.

Проведено генотипирование одного из распространенных ретровирусов животных – вируса лейкоза (ВЛ) крупного рогатого скота (КРС), циркулирующего в Украине, и по результатам ПДРФ-анализа и секвенирования установлена принадлежность украинского изолята к австралийскому подвиду – одному из трех известных подвидов данного патогена.

Разработана система праймеров для детекции провирусной ДНК другого опасного ретровируса животных – вируса иммунодефицита (ВИ) КРС. Ампликон ожидаемого размера был детектирован для трансформированной клеточной линии тестикулов КРС, содержащей провирусную ДНК ВИ КРС, плазмиды с клонированной провирусной ДНК изолята R29 ВИ КРС, а также для ДНК, экстрагированной из лимфоцитов периферической крови сероположительных овец и коров, экспериментально инфицированных ВИ КРС.

Проанализированы неканонические структуры, которые могут образовываться различными вариантами повторов в молекулах ДНК и РНК: шпильчатые, крестообразные, трехцепочечные (триплексы). Созданы карты локализации потенциальных совершенных и несовершенных шпильчатых и крестообразных структур в геномной РНК и провирусной ДНК вирусов лейкоза и иммунодефицита КРС, а также для ряда коронавирусов человека (вируса тяжелого острого респираторного синдрома) и животных (вирусов гепатита мыши, эпидемической диареи свиньи, трансмиссивного гастроэнтерита, бычьего коронавируса).

Установлено распределение потенциальных внутримолекулярных триплексов (образованных полипуриновыми/полипиримидиновыми зеркально-симметричными повторами) в провирусной ДНК ВЛ КРС и ВИ КРС и представлены карты генома вирусов с локализованными триплексами. Показано, что распределения триплексов в геномах ВЛ КРС и ВИ КРС различаются качественно и количественно. Построенные карты локализации шпильчатых структур и триплексов могут быть использованы для структурной дифференциации геномов бактерий и вирусов.

Показано, что совершенные и несовершенные шпильчатые структуры являются высокостабильными (значение свободной энергии стебля шпильки варьирует в диапазоне -10 – -29,8 ккал/моль) генетическими элементами для молекул РНК, которые транскрибируются с плазмид рХО1 и рХО2 возбудителя сибирской язвы *B. anthracis*. Представлены карты плазмид рХО1 и рХО2 с локализованными шпильчатыми структурами. Потенциальные шпильки локализованы в регуляторных генах, элементах с неопределенной функцией или внутри температурно-чувствительного мотива, в которых они могут выполнять роль РНК-термометров.

Ключевые слова: генотипирование, триплекс, шпильчатая структура, микобактерии туберкулезного комплекса, микобактерия туберкулеза, протей, возбудитель сибирской язвы, вирус иммунодефицита крупного рогатого скота, однонуклеотидный полиморфизм, замкнутая нуклеиновая кислота.

SUMMARY

Limanskaya O.Yu. Molecular technologies for typing and detection of bacterial and viral pathogens. – Manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Science in Biology by speciality 03.00.20 – Biotechnology. – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2011.

Results of search of structure functional markers and targets for molecular detection and typing of socially significant pathogens are represented. Based on the single nucleotide polymorphism, molecular genetic sets for differentiation of closely related micobacteria tuberculosis complex, widespread pathogens of human urogenital tract *Proteus mirabilis* and *P. vulgaris*, species-specific detection of members of *Bacillus cereus sensu lato* have been designed. Technologies for detecting of point mutations by allele-specific PCR with primer containing LNA-monomers, additional blocking primer, have been developed. They allow determination of point mutation type and sensitivity or resistance of micobacteria tuberculosis to antituberculosis drug of the first line isoniazid. Typing of circulating in Ukraine bovine leukemia virus (BLV) was performed. From results of RFLP-analysis and sequencing the belonging of Ukrainian BLV isolate to Australian subspecies (one of three known subspecies of this pathogen) was determined. Primer system for detection of proviral DNA of bovine immunodeficiency virus (BIV) has been developed. Maps of localization of perfect and imperfect hairpin-loop structures and triplexes in the BLV, BIV and a number of coronaviral genomes were generated. Distributions of hairpins and triplexes in the BLV and BIV genomes are determined to differ qualitatively and quantitatively.

Keywords: genotyping, triplex, hairpin-loop structure, *Mycobacterium tuberculosis complex*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Proteus sp.*, anthrax infectious agent, bovine immunodeficiency virus, single nucleotide polymorphism, locked nucleic acid.