

РОЗРОБКА ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ ІНДИКАЦІЇ РНК ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО БРОНХІТУ КУРЕЙ СЕРОТИПУ МАССАЧУСЕТС МЕТОДОМ ЗВОРотно-ТРАНСКРИПТАЗНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

А. М. Головка¹, В. О. Постоецько², К. В. Даценко², В. В. Кацімон²,
М. С. Карпуленко², О. С. Карпуленко²

¹Національна академія аграрних наук України

²Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів
(ДНКІБШМ), м. Київ

Наведено результати розробки специфічних праймерів для індикації РНК вірусу інфекційного бронхіту курей серотипу Массачусетс методом зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). Відпрацьовано умови проведення ампліфікації. Визначено оптимальну температуру відпалу праймерів.

Ключові слова: ПРАЙМЕРИ, ІНДИКАЦІЯ, РНК ВІРУС, ІНФЕКЦІЙНИЙ БРОНХІТ КУРЕЙ

Серед респіраторних хвороб птиці, які наносять суттєві економічні збитки промислому птахівництву в Україні, важливу роль відіграє захворювання на інфекційний бронхіт курей (Avian Infectious Bronchitis). Вірус інфекційного бронхіту курей (ІБК) вражає птицю усіх вікових груп та кросів. В Україні існує велика кількість виробників яйця (близько 200 птахофабрик), крім того, значна частина птиці (близько 56 %) вирощується у приватних господарствах. Понад 97 % промислового птахівництва припадає на виробництво яєць та м'яса бройлерів, з них промислове стадо курей-несучок складає 41 %. У зв'язку з інтенсивним розвитком птахівничої галузі зростає необхідність проведення вчасної та швидкої диференційної діагностики випадків респіраторних захворювань серед курей [1, 2].

У залежності від серотипу захворювання може перебігати у різних формах: респіраторній, нефропатогенній та з ураженням репродуктивних органів. Під час диференційної діагностики виключають ньюкаслську хворобу, інфекційний ларинготрахеїт та респіраторний мікоплазмоз птиці. Остаточний діагноз на ІБК ставлять враховуючи клінічні симптоми, дані лабораторних досліджень та епізоотичного обстеження господарства [3].

За даними МЕБ Україна благополучна щодо захворювання на інфекційний бронхіт курей. Але вірусологічні та серологічні дослідження науковців, які працюють над вивченням ситуації щодо випадків гострих респіраторних захворювань птиці на птахофабриках та в приватних підприємствах України, свідчать про циркуляцію вірусу ІБК серед поголів'я птиці. За існуючими літературними даними, ізоляти вірусу інфекційного бронхіту курей, виділені на території України, у переважній більшості, були антигенно споріднені із серотипом Массачусетс [4, 5].

Останнім часом все більшої популярності набуває метод зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР), як високочутливий, специфічний та швидкий тест для індикації геному збудників вірусних захворювань. В основі методу лежить виділення РНК із досліджуваних зразків, проведення реакції зворотної транскрипції з отриманням кДНК на матриці РНК та ампліфікація специфічної ділянки кДНК вірусу за рахунок багаторазового повторення циклів денатурації кДНК у досліджуваній пробі, відпалу

специфічних олігонуклеотидних праймерів і синтезу комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ферменту Taq-полімерази [6, 7, 8].

Початковою стадією у розробці ЗТ-ПЛР тест-системи є розробка праймерів. Специфічність ПЛР залежить від первинної послідовності і температури відпалу праймерів, при якій вони взаємодіють із комплементарними ділянками ДНК-матриці, в результаті чого утворюються дволанцюгові структури [2].

Метою нашої роботи була розробка специфічних олігонуклеотидних праймерів до маркерної ділянки РНК вірусу ІБК серотипу Массачусетс та визначення оптимальних умов проведення ампліфікації.

Матеріали і методи

При розробці специфічних олігонуклеотидних праймерів для ідентифікації вірусу інфекційного бронхіту курей методом ЗТ-ПЛР використовували комп'ютерні програми «Align X Vector NTI Suite» та бази даних GenBank, EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека), DDBJ (Японська база даних нуклеотидних послідовностей).

На стадії виділення нуклеїнової кислоти нами було апробовано декілька методів та їх модифікацій. Для виділення РНК вірусів обрано метод із застосуванням розчину гуанидин ізотіоціанату та сорбенту. РНК з досліджуваних проб виділяли за допомогою набору «РНК-сорб-В» (ЦНДІ Епідеміології, Москва), в основі якого лежить метод сорбції на силікагелі.

З виділеної РНК отримували кДНК за допомогою реакції зворотної транскрипції (ЗТ).

ПЛР проводили на ампліфікаторі (термоциклері) з режимом активного регулювання «Biometa» («Whatman Biometa», Німеччина) за Saiki R. et al. До компонентів реакційної суміші об'ємом 25мкл входили: 67 ммоль трис-НСІ (рН 8,6), 16,6 Мм (NH₄)₂SO₄, 2,0 ммоль MgCl₂, 0,01 % твін-20, по 100 мкмоль дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, по 1,5 мкл кожного з специфічних праймерів, 2 од. Taq-полімерази, по 10 мкл зразків виділеної кДНК. Кількість циклів ампліфікації складала — 35 (табл. 1). Кожний цикл, в свою чергу, складався із таких етапів: денатурація кДНК при 94 °С — 30 сек.; відпал праймерів при температурі 58 °С — 30 сек.; синтез комплементарних ланцюгів при 72 °С — 30 сек. Початкову стадію денатурації та кінцеву стадію елонгації було подовжено до 3 хвилин. Детекцію продуктів ампліфікації проводили методом електрофорезу в агарозному гелі, забарвленому бромідом етидія, з використанням трис-боратного буфера при градієнті напруги 10 В/см.

Результати оцінювали при перегляді гелю після електрофорезу на транслюмінаторі під УФ-світлом по наявності (або відсутності) червоно-помаранчевих фрагментів ДНК певного розміру. Специфічність ампліфікованого фрагмента ДНК визначали його положенням (розміром) по відношенню до фрагментів стандартних маркерів.

Довжина ампліфікованого специфічного фрагмента кДНК вірусу інфекційного бронхіту курей (Avian infectious bronchitis) серотипу *Массачусетс* складала 341 н.з. для першої пари праймерів і 438 н.з. для другої пари праймерів.

Таблиця 1

Режими ампліфікації специфічної ділянки кДНК вірусу ІБК

Етап	Температура, С°	Час	Кількість циклів
1	94	3 хв	1
2	94	30 сек	35
3	58	30 сек	
4	72	30 сек	
5	72	3 хв	1

Результати й обговорення

Підбір чутливих і специфічних праймерів — основна ланка ПЛР, оскільки саме вони забезпечують можливість ампліфікації та індикації необхідної послідовності. З цією метою було проведено вивчення даних літературних джерел та Інтернету, а також здійснена обробка необхідної інформації за допомогою спеціальних комп'ютерних програм. При розробці необхідної пари праймерів дотримувались таких вимог:

1. Праймери повинні мати високу специфічність для зв'язування зі строго визначеними ділянками геному збудника.
2. Праймери не повинні утворювати димери та петлі, тобто не повинні утворюватись подвійні ланцюги в результаті відпалу праймерів самих на себе або одне з одним.
3. Ділянка відпалу праймерів повинна знаходитись поза зоною мутацій, делецій або інсерцій в межах видової або іншої, взятої в якості критерію при підборі праймерів, специфічності.
4. Пара праймерів повинна мати схожу температуру відпалу й константу зв'язування з нуклеїновою кислотою при певних умовах ПЛР [2, 4].

Всього, в результаті вивчення і аналізу літературних джерел, було визначено декілька маркерних послідовностей, що придатні для розробки специфічних праймерів до ділянки геному РНК вірусу інфекційного бронхіту курей.

Для визначення нуклеотидної послідовності праймерів нами було проведено пошук нуклеотидних послідовностей, які обмежують варіабельну ділянку гену S1, яка відповідає за приналежність до певного серотипу вірусу ІБК. Використовуючи комп'ютерну програму «Align X Vector NTI Suite», було розроблено 2 пари праймерів: IBV F1 (forward) і IBV R1 (reverse), IBV F2 (forward) і IBV R2 (reverse). Специфічність розроблених праймерів перевіряли за допомогою Інтернету (програма BLAST). Критичної гомології з нуклеотидним послідовностями інших вірусів, бактерій та грибів не було виявлено. Синтез праймерів на наше замовлення було виконано НВФ «Литех» (Москва, Росія).

Теоретичну температуру відпалу визначали за довжиною праймера і складом ГЦ-пар згідно формулою:

$$T=[(A+T) \times 2] + [(G+C) \times 4] - 5 \text{Ц (K.Itakura et al)}$$

Умови ампліфікації підбирались експериментально з використанням

— СЕВАК МАСС Л - вакцина жива ліофілізована проти інфекційного бронхіту птиці (серотип Массачусетс).

Для визначення специфічності праймерів використовували зразки, які вміщують вірус *Avian Infectious Bronchitis Virus*:

— СЕВАК МАСС Л — вакцина жива ліофілізована проти інфекційного бронхіту птиці (серотип Массачусетс);

— Avipro H-120 — жива ліофілізована проти інфекційного бронхіту птиці (серотип Массачусетс);

— Nobilis IB 4-91 — вакцина жива ліофілізована проти інфекційного бронхіту птиці (серотип 793В);

— Gallivac IB88 — вакцина жива ліофілізована проти інфекційного бронхіту птиці (серотип 793В);

— Nobilis IB Ma5 — вакцина жива ліофілізована проти інфекційного бронхіту птиці (серотип Массачусетс).

Гетерологічні зразки (генетичний матеріал збудників, що не належать до вірусу *Avian Infectious Bronchitis Virus*):

— Nobilis MG 6/85 — вакцина жива ліофілізована проти мікоплазмозу птиці;

— Kolibin RC Neo — вакцина інактивована проти рота-, корона-, та коліінфекцій у новонароджених телят;

— МУЛЬТИКАН-8 — вакцина проти чуми, аденовірусних інфекцій, парвовірусного і коронавірусного ентеритів собак;

— Nobilis ILT — вакцина жива ліофілізована проти інфекційного ларинготрахеїту птиці;

— VIR 107 — вакцина жива ліофілізована проти хвороби Марека.

Негативні контрольні зразки (НКЗ):

— фізрозчин;

— екстраембріональна рідина SPF-ембріонів курей 13-добової інкубації.

Перша і друга пари праймерів (IBV F1 і IBV R1 та IBV F2 і IBV R2) виявилися серотипоспецифічними до певного серотипу вірусу IBK, а саме Массачусетс.

Визначення специфічності пар праймерів проводили при різних температурних режимах: 55 °C, 58 °C, 60 °C (табл. 2).

Результат оцінювали за наявністю або відсутністю чітких світлих жовтогарячо-червоних смужок навпроти кожного зразка. При утворенні нечітких або декількох смужок навпроти одного зразка результат вважали слабо позитивним.

У результаті отримали характерний продукт ампліфікації з праймерами: IBV F1 і IBV R1, IBV F2 і IBV R2 при всіх температурних режимах, але друга пара праймерів показала хибнопозитивний результат з вакциною Nobilis MG 6/85 проти мікоплазмозу птиці. Тому остаточно для подальшої роботи залишили першу пару праймерів IBV F1 і IBV R1.

Таблиця 2

Перевірка різних температурних режимів відпалу розроблених праймерів

№ п/п	Назва зразку	55 °C		58 °C		60 °C	
		IBV F1 і IBV R1	IBV F2 і IBV R2	IBV F1 і IBV R1	IBV F2 і IBV R2	IBV F1 і IBV R1	IBV F2 і IBV R2
1	СЕБАК МАСС Л	+	+	+	+	+/-	+/-
2	Avipro H-120	+/-	+/-	+	+	+/-	+
3	Nobilis IB 4-91	-	-	-	-	-	-
4	Nobilis MG 6/85	-	+/-	-	+/-	-	-
5	Gallivac IB88	-	-	-	-	-	-
6	Nobilis IB Ma5	+	+	+	+	+/-	+/-
7	Kolibin RC Neo;	-	-	-	-	-	-
8	МУЛЬТИКАН-8	-	-	-	-	-	-
9	Nobilis ILT	-	-	-	-	-	-
10	VIR 107	-	-	-	-	-	-
11	фізрозчин	-	-	-	-	-	-
12	НКЗ	-	-	-	-	-	-

Примітка: Позитивний результат — (+); негативний результат — (-); слабо позитивний результат — (+/-)

Аналізуючи отримані результати визначили, що оптимальною температурою відпалу праймерів є температура 58 °C (рис. 1).

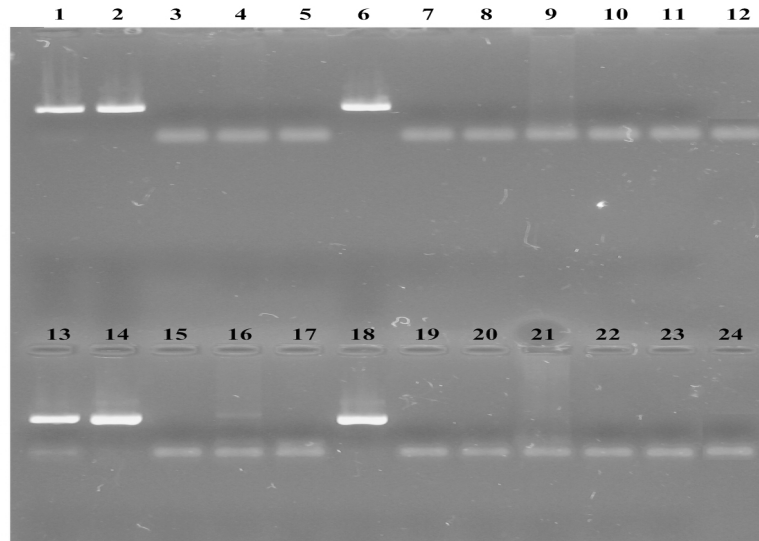


Рис. 1. Результати ампліфікації з праймерами IBV F1 (forward) і IBV R1 (reverse), IBV F2 (forward) і IBV R2 (reverse) при $T=58^{\circ}\text{C}$. 1–12 — IBV F1 і IBV R1; 13–24 — IBV F2 і IBV R2; 1, 13 — СЕВАК МАСС Л; 2, 14 — Авіпро Н-120; 3, 15 — Nobilis IB 4-91; 4, 16 — Nobilis MG 6/85; 5, 17 — Gallivac IB88; 6, 18 — Nobilis IB Ma5; 7, 19 — Kolibin RC Neo; 8, 20 — МУЛЬТИКАН-8; 9, 21 — Nobilis ILT; 10, 22 — VIR 107; 11, 23 — фізрозчин; 12, 24 — екстра ембріональна рідина SPF-ембріонів курей

Висновки

1. Розроблено пару праймерів для детекції РНК вірусу інфекційного бронхіту курей серотипу Массачусетс методом ЗТ-ПЛР.
2. Дана пара праймерів розроблена до консервативної ділянки гену S1 spike glycoprotein gene, яка відповідає за приналежність вірусу ІБК до серотипу Массачусетс.
3. Перевірено три температурних режими (55°C , 58°C , 60°C) та встановлено оптимальну температуру відпалу праймерів – 58°C .

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати буде використано у наступних дослідженнях для створення чутливої і специфічної тест-системи для ідентифікації РНК вірусу інфекційного бронхіту курей серотипу Массачусетс в ПЛР методом зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції.

*A. M. Golovko, V. O. Postoienko, K. V. Datsenko, V. V. Katsimon,
M. S. Karpulenko, A. S. Karpulenko*

DEVELOPING OF PRIMERS FOR DETECTION OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS MASSACHUSETTS SEROTYPE WITH REVERSE-TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD

S u m m a r y

The results of the development of specific primer for detection of RNA avian infectious bronchitis virus Massachusetts serotype by the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Spent different primer annealing temperatures (55 – 60°C). The optimum annealing temperature of primers.

А. Н. Головки, В. А. Постоевко, К. В. Дацено, В. В. Кацимо, М. С. Карпуленко, А. С. Карпуленко

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ РНК ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР СЕРОТИПА МАССАЧУСЕТС МЕТОДОМ ОБРАТНО-ТРАНСКРИПТАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

А н н о т а ц и я

Приведены результаты разработки специфических праймеров для индикации РНК вируса инфекционного бронхита кур серотипа Массачусетс методом обратной-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Отработано условия проведения амплификации. Определена оптимальную температуру отжига праймеров.

1. Бочков Ю. А. Диагностика инфекционного бронхита кур [Текст] / Ю. А. Бочков, А. В. Борисов, С. В. Фролов и др. // Ветеринария. — 2003. — № 4. — С. 21–24.
2. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине : справочное пособие [Текст] / А. Н. Головки, В. А. Ушкалов, В. Г. Скрыпник и др. ; ред. А. Н. Головки. — Харьков : НТМТ, 2007. — С. 243–250.
3. Casais R. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism [Text] / R. Casais, B. Dove, D. Cavanagh, P. Britton // Journal of virology. — 2003. — Vol. 77, № 16 (Aug.). — P. 9084–9089.
4. Нестерова Л. Ю. Біологічні та імуногенні властивості епізоотичних штамів вірусу інфекційного бронхіту курей : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук : спец. 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія та вірусологія» / Л. Ю. Нестерова. — Харків, 2008. — 23 с.
5. Спасов А. М. Розробка дослідних зразків інактивованих вакцин проти інфекційного бронхіту курей та вивчення їх імуногенної активності [Текст] / А. М. Спасов, Є. В. Герман, С. І. Вовк, В. В. Герман // Ветеринарна медицина. — 1999. — Вип. 76. — С. 102–107.
6. Головки А. М. Розробка праймерів для детекції вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней полімеразною ланцюговою реакцією [Текст] / А. М. Головки, В. Н. Гаврасьєва, В. О. Постоевко та ін. // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. — Львів, 2009. — Вип. 10, № 3. — С. 146–149.
7. Liu Shengwang. Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*) [Text] / Shengwang Liu, Jianfei Chen, Jinding Chen et al. // Journal of General Virology. — 2005. — Vol. 86. — P. 719–725.
8. Velayudhan Binu T. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the diagnosis of turkey coronavirus infection [Text] / Binu T. Velayudhan, Hyun-Jin Shin, Vanessa C. Lopes et al. // J. Vet. Diagn. Invest. — 2003. — Vol. 15. — P. 592–596.

Рецензент: доктор ветеринарних наук, професор, академік НААН України В. В. Влізло