

МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ В ДЕТЕКЦІЇ ТА ТИПУВАННІ ПАТОГЕННИХ ВІРУСІВ ТА БАКТЕРІЙ

*І.Ю. Горбатенко, доктор біологічних наук, професор, дійсний член
Нью-Йоркської академії наук
Миколаївський національний аграрний університет*

*Представлено сучасні методи діагностики патогенів, що викорис-
товуються у медичній біотехнології та молекулярній біології. Особли-
ва увага приділяється методу генотипування, що в наш час отримав
найбільше застосування у практиці.*

Ключові слова: методи, молекули, біологія, патогени, плазміди.

Вступ. У діагностиці патогенів у ветеринарній медицині використовують методи молекулярної біології, такі як прямий імуноферментний аналіз, непрямий імуноферментний аналіз, реакція імунодифузії в агарі та полімеразно-ланцюгова реакція.

Історично склалося, що одним з перших факторів визначення видів патогенів (бактерій) став нуклеотидний склад ДНК. Тому генотипування (ДНК-типування) – це процес діагностики геному організму (геномна ДНК). Молекулярні методи діагностики стали використовувати у середині минулого сторіччя, коли Meyers та інші стали використовувати для наявності аналізу плазмід за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

У 1984 р. Schwartz, Cantor запропонували метод гелелектрофорезу у пульсуючому полі, що базувався на розділенні значних фрагментів ДНК (10-800 тис. пар нуклеотидів). Цей метод широко використовується у молекулярній епідеміології, завдяки відтворюваності результатів та високій дискримінуючій потужності для диференціації та типування великої кількості різних штамів патогенів (грам-негативні, грам-позитивні бактерії а також гриби). Цей метод дає змогу аналізувати близько 90% бактеріальної хромосоми, що дало цьому методу право вважатися стандартним. Цей метод дав можливість

розглядати ізоляти бактерій з однаковими рестрикційними паттернами як нерозрізнені. Ізоляти, які відрізняються на 3 та менше позицій рестрикційних фрагментів, вважаються близько родинними, а ізоляти, які відрізняються на 4-6 позицій рестрикційних фрагментів, розглядаються як можливо родинні. В інших випадках – ізоляти неспоріднені. Цей метод є складним внаслідок тривалості аналізу (5-6 днів), значних витрат як матеріальних статків, так і фізичних.

Плазмідний аналіз. Плазмідні – це невеликі кільцеві молекули ДНК, які є автономними і характеризуються резистентністю до антибіотиків та визначають фактор вірулентності бактерій. У 1986 р. Schaberg, Zervos використали плазмідний аналіз (перший молекулярний метод для типування грам-позитивних та грам-негативних бактерій). При цьому значення мали кількість і розмір плазмід. В епідеміології цей метод дає змогу розрізняти ендемічні та епідемічні штами, а також є фактором при визначенні стійкості до антибіотиків. Недоліком цього методу є те, що він є інформативним, при цьому є можливість існування різних профілів.

Метод поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів. Цей метод базується на визначенні набору смуг різної довжини для неспоріднених бактеріальних штамів, використовується для їх диференціації. При використанні з полімеразно-ланцюговою реакцією (ПАР) з ген-специфічними праймерами метод поліморфізму довжини рестрикційних ферментів надає можливість генотипування патогенних мікроорганізмів за допомогою визначення специфічних локусів ДНК, визначення вірулентності штамів, а також локального розповсюдження різних генотипів конкретного патогена. Недоліком цього методу є його дискримінуюча потужність, що дає перевагу іншим методам, таким як риботипування та ампліфікація ДНК з випадковими праймерами.

Риботипування. У 1989 р. Т. Чеку та С. Олтмену було вручено Нобелівську премію за відкриття ферментної активності рибонуклеїнових кислот (рибозимів). Медичні та біологічні дослідження рибозимів і антисмислових РНК (асРНК) виявили ефективність їх використання для інгібування репродук-

ції патогенних вірусів. З цього погляду ці комплекси адресних рибополінуклеотидів являють собою потенційно могутній інструмент у медичній і ветеринарній практиці, тому що можуть бути використані в генетичній терапії, а також дають реальну можливість для створення порід трансгенних тварин, стійких до декількох вірусних інфекцій.

Метод риботипування – різновид саузерн-блотингу, у якому фрагменти ДНК гібридизуються з оперонами рибосомальної ДНК, що кодує гени 16S та/або 23S рРНК та мають висококонсервативні послідовності. В зв'язку з тим, що кількість цих послідовностей у різних видів бактерій змінюється, це дає можливість ідентифікації епідемічних штамів, їх ідентифікації та диференціювання у зв'язку з великим числом оперонів. Недоліком цього методу є те, що дискримінуючи потужність рибосомів незначна для типування бактерій з обмеженою кількістю оперонів (мікобактерії або ентерококи). Для більш широкого застосування цього методу обмеженням є відсутність колекції стандартизованих типових штамів.

Секвенування. Цей метод був розроблений у 70-х рр. минулого сторіччя для визначення нуклеотидної послідовності ДНК. Sanger, Coulson у 1975 р. запропонували метод прямого ферментного секвенування. У 1977 р. Maxam, Gilbert для секвенування запропонували специфічну хімічну деградацію фрагмента. В наш час секвенування відбувається автоматизовано, що залежить від типу секвенатора та методу і дозволяє визначати послідовності довжиною від 400 до 1000 і більше нуклеотидів, що значно менше у порівнянні з довжиною хромосомної ДНК. Для типування мікроорганізмів та розділення штамів шляхом секвенування ідентифікують варіабельний фрагмент геномної ДНК, який не передається горизонтально до інших штамів. Наприклад короткі охарактеризовані фрагменти ДНК вірусів, які використовуються для їхнього типування. У бактерій секвенування, крім типування, дає можливість виявити мутацію в генах, що пов'язані зі стійкістю до ліків. У зв'язку з високою дискримінуючою здатністю та відтворюваністю цей метод є перспективним для вивчення організмів,

які не культивуються з невизначеними фенотиповими ознаками. Недоліком цього методу є значна матеріальна вартість.

Метод ампліфікації поліморфної ДНК із застосуванням випадкових праймерів.

Williams у 1990 р. запропонував використання цього методу для генотипування бактерій та проведення цілеспрямованих епідеміологічних досліджень штамів патогенів, що культивуються на штучних живильних середовищах. Метод базується на застосуванні ампліфікації випадкових фрагментів геному в умовах не суворого зв'язування емпірично визначених праймерів (олігонуклеотиди довжиною 10-15 нуклеотидів) з ДНК мішенню за низької температури. Недоліком цього методу є ймовірність отримання неістотних результатів, що заперечує використання його як стандартного методу.

Поліморфізм довжини ампліфікаційних фрагментів.

Спочатку цей метод використовувався для ідентифікації геномів рослин, потім його стали використовувати і для типування бактерій. Метод базується на проведенні вибіркової ампліфікації фрагментів, отриманих після обробки екстрагованої та очищеної бактеріальної ДНК ферментами рестрикції та лінійованих з олігонуклеотидами – лінкерами, що містять сайт-рестрикції, з використанням комплементарних їх праймерів, які мітяться при використанні флуоресцентної та радіоактивної мітки для подальшої візуалізації отриманих паттернів рестрикції. В практичних умовах можлива візуалізація за допомогою гелі-електрофорезу. Порівняно з іншими методами генотипування, цей метод є об'єктивним у визначенні диференціації штамів з можливістю швидкого отримання відтворюваного результату.

Поліморфізм конформації одноланцюгової ДНК.

У 1989 р. Orita, Iwahama та ін. запропонували метод аналізу конфірмативної одноланцюгової ДНК для визначення на різній електрофоретичній рухливості невеликих одноланцюгових фрагментів ДНК, з однаковою їх довжиною, але різною конформацією внаслідок нуклеотидної заміни. У зв'язку з тим, що цей метод є простим та має незначну вартість, його широ-

ко застосовують для ідентифікації штамів бактерій, генотипування тварин та ін.

Полімеразно-ланцюгова реакція.

Успіхи, досягнуті за останні роки сучасною біологічною медициною та ветеринарією, привели до створення нового методу дослідження в молекулярній біології гена – полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР). Метод ПЛР, за відкриття якого у 1993 р. К. Mullis була присуджена Нобелівська премія з хімії, корінним чином змінив молекулярну генетику та біологію. Головна ідея ПЛР полягає в ідентифікації специфічного фрагменту молекули ДНК з наступним багатократним (105- 108 разів) його копіюванням за допомогою термостабільної ДНК-полімерази та праймерів, фланкуючих ділянку ДНК.

Досягненню максимально високих результатів дослідження сприяє оптимальний вибір «конфігурації» ПЛР-аналізу. Нами подано оптимальний варіант ПЛР – аналізу, що розрахований на звичайне обладнання без використання ферментів рестрикції, гібридизації зі специфічними зондами та флуоресцентно мічених праймерів, оскільки це призведе до ускладнення аналізу та підвищення його собівартості.

Висновок. Порівняння методів генотипування показали, що існуючі технології ДНК на основі молекулярно-генетичних методів з різними форматами ПЛР в більшості випадків мають високу точність, швидкість і надійність в порівнянні з існуючими фенотиповими методами виявлення і диференціації патогенів.

Список використаних джерел:

1. Горбатенко І. Ю. ДНК аналіз у криміналістиці / І. Ю. Горбатенко. — Херсон : Видавець Чуєв С.М., 2007. С. 123.
2. Горбатенко І. Ю. Перспективність застосування рибози мів у епідеміології вірусних хвороб у процесі використання модифікованих організмів / І. Ю. Горбатенко, К. В. Шамраєв, М. І. Гиль // Матеріали науково-практичного семінару «Проблеми отримання та використання генетично модифікованих і клонованих організмів» 11 березня 2004р. — 2004. — С. 62 — 64.
3. Горбатенко І. Ю. Особливості молекулярних технологій в детекції та типуванні патогенних бактерій та вірусів / І. Ю. Горбатенко // Причорноморська регіональна науково-практична конференція професорсько-викладацького складу. — Миколаїв, 2011.
4. Детекция вируса лейкоза КРС с использованием полимеразно-цепной реакции / О. Ю. Лиманская, А. П. Лиманский и др. // Вісник аграрної науки. — 1999. — № 9. — С. 35 — 39.

5. D. C Schwartz, C. R. Cantor // Cell. — 1984. — Vol. 37, № 1. — P. 67 — 75.
6. D. R. Schaberg , M. Zervos // Rev. Infect. Dis. — 1986. — Vol 8, № 5. — P. 705 — 712.
7. F. Sanger, A. R. Coulson//J. Mol. Biol. — 1975. — Vol. 94, № 3. — P. 441 — 448.
8. A. M. Maxam, W. Gilbert// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74, №2. — P. 560 — 564.
9. J. G. Williams [et. al] // Nucleic Acids Res. — 1990. — Vol. 18, № 22. — 6531 — 6535.
10. M. Orita, H. Iwahana, H. Kazanawa, T. Sekya // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1989. Vol. 86, № 8. — P. 2766 — 2770.
11. Mullis. K. // Methods of enzymology / K. Mullis., F. Faloona // Academic Press. — 1987. — Vol. 155, — P. 335 — 350.

И.Ю. Горбатенко. Методы молекулярной биологии в детекции и типировании патогенных вирусов и бактерий.

Представлены современные методы диагностики патогенов, которые используются в медицинской биотехнологии и молекулярной биологии. Особенное внимание уделяется методу генотипирования, который в наше время наиболее применяется на практике.

I. Gorbatenko. Molecular biology techniques in the detection and typing of pathogenic viruses and bacterias.

The modern methods of diagnosis of pathogens used in medical biotechnology and molecular biology are submitted. Particular attention is given to the method of genotyping that nowadays getting used in practice most frequently.