

УДК:619:636.09

М. А. САПАЧОВА, , аспірант*

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

МОЛЕКУЛЯРНО – ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ В ВЕТЕРИНАРНІЙ ПРАКТИЦІ

Наведено огляд літератури з використання методу полімеразної ланцюгової реакції у ветеринарній практиці. Показано, що ПЛР є експрес-методом при діагностиці інфекційних захворювань. Обґрунтовано, що перспективним напрямком наступних досліджень є розробка простих і чутливих методів експрес діагностики, заснованих на ізотермічній ампліфікації нуклеїнових кислот.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція, ампліфікація, нуклеїнова кислота.

Сьогодні засоби профілактики захворювань тварин займають значну долю у практиці ветеринарної медицини. При цьому важливим є проведення постійного моніторингу особливо небезпечних захворювань, що дає можливість своєчасно виявляти інфікування тварин та ліквідовувати вогнища захворювання, а також робити оцінку щодо епізоотичної ситуації стосовно будь-якого захворювань. Вивчення збудника та його діагностика має велике значення, оскільки існує ряд захворювань, спалах яких може завдати великих збитків державі. Це в свою чергу зумовлює необхідність розроблення та застосування експрес-методів діагностики з метою якнайшвидшої ідентифікації збудника.

Тому метою роботи є огляд даних літератури з існуючих молекулярно – генетичних методів досліджень. Серед них широкої популярності набувають такі методи, як: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), рестрикційно-ензимний аналіз, секвенування. Вчасна та достовірна діагностика вірусних захворювань – реальна перспектива попередити колосальну загрозу, яка може виникнути в разі спалаху гострої інфекції. Тому, саме діагностичний засіб може стати запорукою при вирішенні долі тварин та птиці, підозрілих у захворюванні на вірусну інфекцію, та дозволить зробити вибір запобіжного заходу в разі виникнення складної епізоотичної ситуації.

В Україні молекулярні методи у ветеринарній практиці, зокрема полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР), набувають все більшої ваги.

Молекулярно-генетичні методи – це велика та різноманітна група, призначена для виявлення варіацій у структурі ділянки ДНК до розшифровки первинної послідовності нуклеотидних залишків. В основі цих методів лежать генно-інженерні маніпуляції з ДНК та РНК.

Вихідним етапом всіх молекулярно-генетичних методів є отримання зразків нуклеїнових кислот. Можливість проведення молекулярно-генетичного аналізу з невеликою кількістю легкодоступного біологічного матеріалу є перевагою методів даної групи [1-2].

У Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно – санітарної експертизи моніторингові дослідження вірусних захворювань методом ПЛР проводяться впродовж 8 років. Як свідчить досвід проведеної роботи, дослідження, виконанні на молекулярно – генетичному рівні, дозволяють у короткі терміни оцінити епізоотичну ситуацію, суттєво зберегти час на вживання запобіжних заходів та звести економічні збитки до мінімуму. Висока специфічність, чутливість та відтворюваність даного методу дослідження є запорукою надійного контролю якості сільсько-господарської продукції.

Отже, на сьогоднішній день перспективно застосовувати метод ПЛР для діагностики інфекційних захворювань.

Полімеразна - ланцюгова реакція (ПЛР) – це метод ампліфікації *in vitro*, за допомогою якого протягом декількох годин можна виділити і розмножити визначену послідовність ДНК у кількості, що перевищує вихідну в мільйони разів. Принцип метода ПЛР був розроблений Кері Мюлісом у 1983 році. ПЛР – це процес, що протікає в одній пробірці та складається з повторних циклів ампліфікації (розмноження, копіювання) специфічної послідовності молекули ДНК із метою одержання достатньої великої кількості копій, що можуть бути виявлені звичайними методами детекції [2].

Класичним варіантом постановки ПЛР є типові трьох-(чотирьох) стадійна модифікація реакції, що супроводжується екстракцією ДНК-(РНК), ампліфікацією з наступною візуалізацією ампліконів за методом електрофорезу в агарозному гелі на ТВЕ-буфері. Облік результатів починають з результатів ампліфікації позитивного та негативних контролів. В електрофоретичному треку, який відповідає позитивному контролю, повинна бути жовтогаряча смуга. Її електрофоретична рухомість відповідає вказаній в інструкції довжині амплікону. Інтенсивність світіння смуги залежить від кількості нуклеїнової кислоти у пробі, що досліджується (рис.1).



Рис. 1. Облік результатів полімеразної ланцюгової реакції з електрофоретичною детекцією

Трек №1- маркер молекулярної ваги; **№2** – позитивний контрольний зразок (K+); **№ 3** – негативний контрольний зразок (K-); **№ 4, 5** – негативні зразки

Переваги методу ПЛР як методу діагностики інфекційних захворювань:

1. Пряме визначення наявності збудника;
2. Висока чутливість та специфічність;
3. Універсальність процедури виявлення різних збудників;
4. Швидкість одержання результатів аналізу;
5. Можливість діагностики не тільки гострих, але й латентних інфекцій.

Обмеження методу ПЛР:

1. Можливість перехресної реакції;
2. Ампліфікується ДНК як живого, так і загиблого мікроорганізму;
3. Ризик контамінації.

Новий напрямок розвитку молекулярно – генетичних досліджень – це метод полімеразно – ланцюгової реакції в режимі реального часу (ПЛР-РЧ). У ПЛР в реальному часі використовують флуоресцентні барвники, які забезпечують безперервний моніторинг флуоресцентного сигналу прямопропорційного кількості ПЛР-продукту. Для виявлення продуктів ампліфікації в режимі реального часу застосовують різні технології, які різняться способом генерації флуоресценції. Найбільш широко використовують наступні модифікації: MolekularBeacons (молекулярні маячки), FRET (Fluorescence resonance energy transfer, резонансне перенесення енергії флуоресценції) та TagMan. В основі методу лежить виділення в досліджуваній пробі вірусної РНК, проведення реакції реверс транскрипції (РТ) та ампліфікація специфічної ділянки РНК вірусу при використанні олігонуклеотидних праймерів і синтезу комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ферменту Таq-полімерази [3-5]. Детекція продуктів ампліфікації здійснюється шляхом вимірювання флуоресценції фотооптичною системою термостата-ампліфікатора. Присутність в реакційній суміші ферменту

урацил-ДНКглікозилази (UDG), дозволяє уникнути кросс-контамінації досліджуваних зразків продуктами ампліфікації попередніх досліджень. Основним критерієм оцінки отриманих результатів є визначення граничного циклу (C_t), що характеризує певний цикл ПЛР-РЧ, на якому спостерігається статистично достовірне збільшення флуоресценції у порівнянні з фоновим рівнем[5].

На рисунку №2 наведені сигмоїдні криві, які вказують на достовірність проведення ПЛР-РЧ. Результат вважається достовірним тільки у випадку проходження позитивних і негативних контролів ампліфікації та негативного контролю виділення нуклеїнової кислоти. Сигмоїдні криві пересікаються з встановленою на відповідному рівні пороговою лінією, яка відповідає наявності або відсутності значення порогового циклу у відповідній графі в таблиці результатів(рис.2).

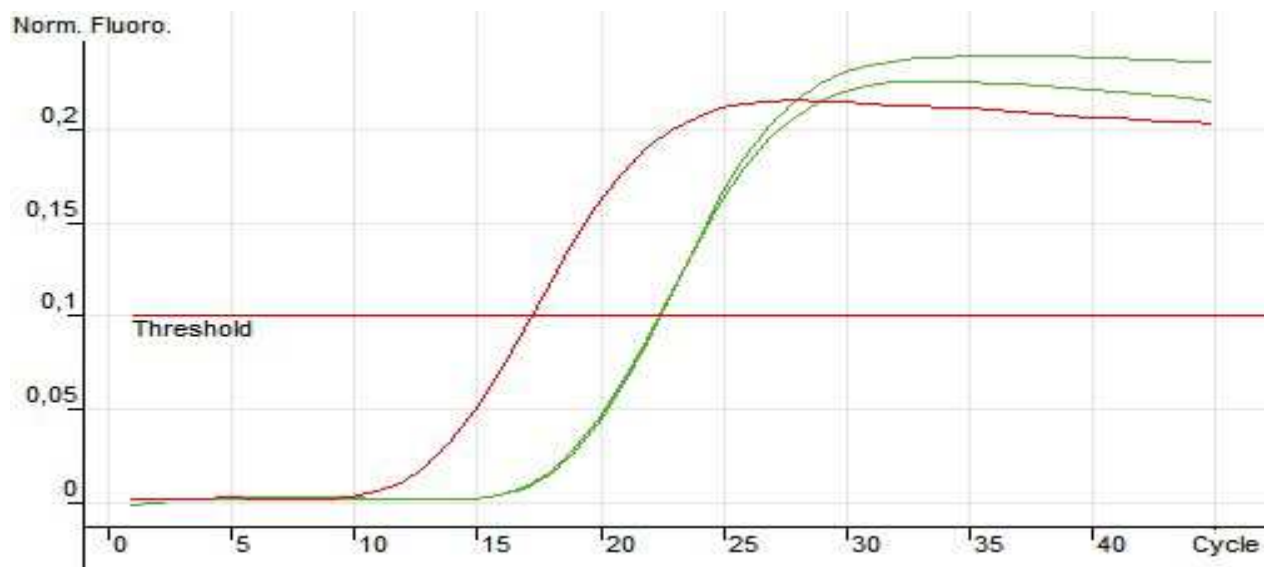


Рис. 2. Сигмоїдні криві, які показують кількість циклів ампліфікації щодо значення флуоресцентного сигналу.

ПЛР у реальному часі має ряд значних переваг:

1. Об'єднання етапів ампліфікації та детекції результатів.
2. Зниження ризику контамінації та помилок при аналізі результатів.
3. Висока специфічність реакції за рахунок використання високо специфічних флуоресцентних зондів.
4. Висока продуктивність.
5. Можливість кількісного визначення ДНК матриці.
6. Реєстрація та облік даних в електронному форматі.

Для проведення аналізу ПЛР-РЧ необхідна наявність спеціального прилада – ампліфікатора для ПЛР в реальному часі, який поєднує в собі функції термоциклера та флуоресцентного детектора.

Сьогодні лабораторії ветеринарної медицини України не мають в

достатній кількості обладнання для проведення досліджень методом ПЛР в режимі реального часу. Відсутність достатнього фінансування обмежує впровадження сучасних методів аналізу в українських діагностичних лабораторіях. Ця обставина в свою чергу, спонукає до пошуку інших альтернативних методів, які характеризуються високою швидкістю та економічністю аналізу. Тому важливим є розробка простих і чутливих експрес - методів діагностики, адаптованих до місцевих умов.

Одним із таких є новий метод, який заснований на ізотермічній ампліфікації нуклеїнових кислот (LAMP)[4].

Це простий, швидкий та високочутливий метод, який можна використовувати для діагностики вірусних захворювань за допомогою простого обладнання. Цей метод дозволяє з високою специфічністю та ефективністю проводити ампліфікацію нуклеїнових кислот при постійній температурі і, на відміну від циклічної ампліфікації, не потребує наявності термоциклера (ПЛР – ампліфікатора) [4].

У даній методиці використовуються визначені праймери в поєднанні з ферментом полімерази BST. У запропонованій ними процедурі дволанцюгова ДНК розплітається на одинарні ланцюги ферментом геліказою. Цей білок рухається уздовж молекули ДНК, тимчасово розриваючи зв'язки між ланцюгами. Ампліфікація нуклеїнових кислот відбувається на водяній бані в ізотермічних умовах (60-65°C) протягом від 30 до 60 хв. Подібно звичайній ПЛР, ізотермічна ампліфікація дозволяє збільшувати вміст ДНК в пробі в мільйони разів та дозволяє отримати готовий результат протягом години. Облік реакції проводиться візуально, шляхом додавання флуоресцентного реагенту (кальцеїн і $MnCl_2$, SYBRGREEN та інш.) в реакційну суміш для спостереження за зміною кольору при денному світлі або ультрафіолетовому випромінюванні (рис. 3)[5-6].

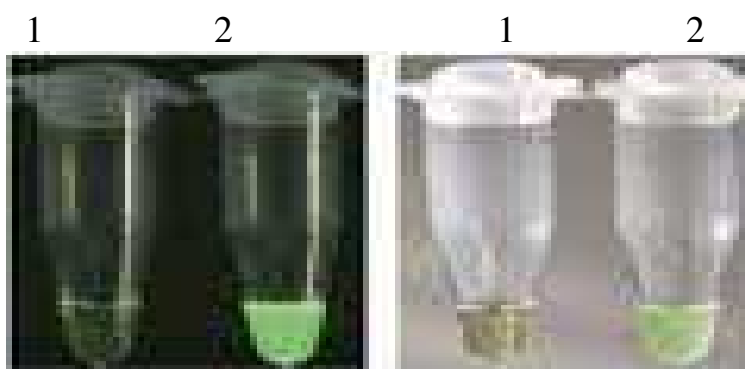


Рис. 3. Облік реакції продуктів ампліфікації методом LAMP:

1- негативний зразок; 2 – позитивний зразок

Візуально бачимо, що в негативному контролі (проба №1) відсутнє забарвлення суміші в пробірці, а в позитивному (проба №2), в залежності від світофільтра або використаної фарби, суміш має забарвлення від жовтого до зеленого кольору.

Враховуючи вищенаведене, в даний час нами проводяться дослідження, спрямовані на розробку та удосконалення експрес-методу діагностики інфекційних захворювань, а саме методу ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот.

Висновки:

1. Показано, що метод полімеразної ланцюгової реакції є експрес-методом при діагностиці інфекційних захворювань.
2. Обґрунтовано, що метод ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот (LAMP) є перспективним напрямком в експрес діагностиці інфекційних захворювань тварин. Розробка та впровадження в практику лабораторій ветеринарної медицини України цього методу дасть змогу своєчасно контролювати занесення збудників захворювань на територію країни.

Список використаної літератури

1. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини. Науково – методичний посібник. Б. Т. Стегній, А. П. Герілович // Харків, 2006. – С.18-20.
2. Практикум по ветеринарної вирусології. / Белоусова Р. В., Троценко Н. И., Преображенская Э. А. – М.: Колос, 2006.-248 с.
3. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Глик Б., Пастернак Дж. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
4. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарної медицине. Справочное пособие / А. Н. Головки, В. А. Ушкалов, В. Г. Скрыпник, Б. Т. Стегний и др; Под ред. А. Н. Головки. – Х.: «НТМТ», 2007.– 512 с.
5. Современные направления использования ДНК-технологий / Глазко В. И., Доманский Н. Н., Созинов А. А. // Цитология т и генетика.1998.– Т. 32.– №5.– 80-93.
6. J. Ji, Molecular detection of Muscovy duck parvovirus by loop – mediated isothermal amplification assay. / J. Ji, Q. M. Xie, C. Y. Chen and all // Pultru Science. – 2010. – Vol 89: 477, P. 477 – 483.
7. Shivakoti, S., Ito, H., Murase, T., Ono, E., Takakuwa, h., Yamashiro, T., Otsuki. Development of reverse transcription – loop – mediated isothermal amplification (RT – LAMP) assay for detection of avian influenza viruses in field specimens // J. Vet. Med. Sci. – 2010. – Vol. 72. – P. 519 – 523.
8. ManmohanParida, Loop – Mediated Isothermal Amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infection diseases. / ManmohanParida, SanthoshSannarangaiah, Padan Kumar Dash and all // Rev. Med. Virol. – 2008. Vol 18, P. 407 – 421.

МОЛЕКУЛЯРНО –ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В ВЕТЕРИНАРНОЙ ПРАКТИКЕ / М. А. Сапачева

Представлен обзор данных литературы использования метода полимеразной цепной реакции в ветеринарной практике. Показано, что метод ПЦР является экспресс-методом при диагностике инфекционных заболеваний. Обосновано, что перспективным направлением последующих исследований являться разработка простых и чувствительных методов экспресс диагностики, основанных на изотермической амплификации нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, амплификация, нуклеиновая кислота.

MOLEKULAR GENETIC RESEARCH METHODS OF VETERINARY PRACTICE/ M. A. Sapacheva

The review of the literature of the polymerase chain reaction in veterinary practice. Demonstrated that PCR - rapid method for the diagnosis of infectious diseases. It is proved that the prospective directions of further research is the development of simple and sensitive methods to express diagnosis on the basis of the isothermal amplification of nucleic acids.

Keywords: polymerase chain reaction, amplification, nucleic acid.

Рецензент-доктор ветеринарных наук В. В. Чумаченко.

Рукопис надійшов 24. 07. 2013р.