

Висновки. 1. Показано інформативність рестрикційного картування 580 п.н. ділянки гена NP вірусу ньюкаслської хвороби для патотипування збудника та відповідність його результатів даним секвенування цього фрагменту та фрагменту гена F0 у локусі сайту розрізання. **2.** Встановлено належність українських ізолятів вірусу НХ до генотипів 1, 2, 4d, 5a та 5d, а також доведено, що секвенування суміжних областей кладоспецифічної ділянки гена F0 репрезентує однакові результати при генотипуванні чинника.

Список літератури

1. Alexander, D.J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections [Text] / Alexander D.J. // Diseases of Poultry / B.W. Calnek (Ed.). — 9th ed. — Iowa State Univ. Press, 1991. — P. 496–519.
2. Orthomyxo-, paramyxo- and flavivirus infections in wild waterfowl in Finland [Text] / Lindh E. [et al.] // J. Virol. — 2008. — Vol. 28. — P. 5–35.
3. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [Text] / O.I.E. — 6th ed. [text]. — Paris, 2008. — 1343 pp.
4. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis [Text] / Seal B.S. [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1995. — Vol. 33. — P. 2624–2630.
5. Molecular characterization of three new virulent Newcastle disease virus variants isolated in China [Text] / Tan L. T. [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2008. — Vol. 46, № 2. — P. 750–753.
6. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene [Text] / Aldous E.W. [et al.] // Avian Pathol. — 2003. — Vol. 32, № 3. — P. 239–256.
7. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity [Text] / Collins M.S. [et al.] // Arch. Virol. — 1993. — Vol. 128. — P. 363–370.

MOLECULAR METHODS FOR NEWCASTLE DISEASE VIRUS GENOTYPING AND PATHOTYPING

Gerilovych A.P.

National scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”,
Kharkiv

Newcastle disease is world-distributed viral disease of poultry and wild birds of big list of species. The work is devoted to comparison of main approaches for genotyping and pathotyping of NDVs on the base of molecular techniques. The main characteristics of restriction mapping, sequencing of NP and F genes were described. 13 field isolated were genotyped and pathotyped by these methods.

УДК 619:578.832.1: 636.5:616-07

РОЗРОБКА ПОЗИТИВНОГО КОНТРОЛЬНОГО ЗРАЗКА ГЕНА ГЕМАГЛЮТИНИНУ ВІРУСУ ГРИПУ ПТИЦІ СУБТИПУ Н7 ЄВРОПЕЙСЬКОГО ГЕНОТИПУ НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК

Герілович А.П., Симоненко С.І., Болотін В.І., Солодянкін О.С.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна

Робота присвячена створенню плазмідного вектору як позитивного контрольного зразка для діагностики грипу птиці (тип А, субтип Н7) з використанням методики виявлення РНК Європейського генотипу високопатогенного грипу птиці субтипу Н7 за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, розробленої співробітниками Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». При створенні плазмідного контролю вибрані найбільш оптимальний тип вектора, підібрані й оптимізовані методи виділення й очистки плазмідної ДНК. Показана висока внутрішньовидова специфічність отриманого рекомбінантного контрольного зразка та його стабільність при зберіганні. Подальші дослідження будуть спрямовані на створення плазмідного контролю при діагностиці грипу птиці субтипу Н7 Американського генотипу.

Грип птиці — це захворювання, яке викликають будь-які віруси типу А, що належать до сімейства *Orthomyxoviridae*. Віруси типу А зустрічаються в людей, свиней, коней, інколи в інших ссавців, а також у багатьох видів птахів. Пташиний грип, як правило, не уражає диких птахів, однак, серед свійської птиці призводить до тяжкого захворювання та масової загибелі. Незважаючи на високу видоспецифічність

вірусів пташиного грипу, в рідких випадках вони долають видовий бар'єр та інфікують людей [3,4].

Інфікування вірусами пташиного грипу призводить до розвитку двох основних форм хвороби, які розділяються за ступенем вірулентності. Так звана низькопатогенна форма зазвичай викликає лише легкі симптоми захворювання та може залишатися нерозпізнаною. Високопатогенна форма дуже швидко розповсюджується у пташиних зграях і викликає хворобу, яка призводить до загибелі майже у 100 % випадків, часто протягом 48 годин [6].

Існуючі на сьогодні ПЛР тест-системи для індикації вірусу пташиного грипу різних субтипів передбачають використання в якості позитивного контролю при проведенні реакції нативної зразки вірусу, які потребують виділення РНК з проведенням подальшої зворотної транскрипції для напрацювання комплементарної ДНК (кДНК). Додаткове виділення РНК з нативних зразків не є дуже зручним, оскільки це займає певний час, саме ж РНК погано зберігається у вигляді контрольного зразка. Тому доцільно зберігати його у вигляді плазмідного векторного контрольного зразка, який можливо сконструювати завдяки методам молекулярної біотехнології.

Молекулярна біотехнологія – це область науки, в основі якої лежить перенесення одиниці спадковості (генів) з одного організму до іншого, яке здійснюється методами генної інженерії (технологія рекомбінантних ДНК). У більшості випадків метою такого перенесення є створення нового продукту або отримання вже відомого продукту в промислових масштабах [1].

Технологія рекомбінантних ДНК включає в себе цілий набір експериментальних процедур, завдяки яким вдається виділити (клонувати) фрагменти ДНК, які містять специфічні гени.

Типовий експеримент з клонування генів складається з рестриктазного розщеплення ДНК, виділеної з організму-донора, яка утримує необхідний ген, підготовки вектору для клонування, спрямоване зшивання векторної і зонарної ДНК лігазами та трансформації зшитими рекомбінантними молекулами комплементарних клітин-реципієнтів. Уведені до трансформованих клітин рекомбінантні ДНК здатні до незалежної ампліфікації.

У ветеринарній біотехнології методи отримання рекомбінантних ДНК використовують при створенні векторних контролів у різноманітних тест-системах для діагностики захворювань сільськогосподарських тварин, особливо зооантропонозів та інфекцій, зумовлених РНК-вміщуючими вірусами, а також у створенні плазмідних векторів для конструювання ДНК-вакцин.

Метою нашої роботи був підбір найбільш оптимального вектора для створення плазмідного контролю при використанні методики виявлення РНК Європейського генотипу високопатогенного грипу птиці субтипу Н7.

Матеріали і методи. Для створення плазмідного вектора використовували стандартні методи молекулярного клонування нуклеїнових кислот. В якості донорної ДНК використовували ампліфіковану кДНК ділянку НА-гену вірусу грипу Н7 Європейського генотипу довжиною 641 п. н.

Ізоляцію вірусної РНК проводили сорбентним методом з використанням комерційних наборів виробництва фірми АмпліСенс (Російська Федерація). Для напрацювання кДНК застосовували реакцію зворотної транскрипції з використанням ревертази виробництва фірми Fermentas (Латвія) та набору «Реверта-Л» виробництва «Центрального науково-дослідного інституту епідеміології» (Росія) згідно з протоколом виробника. Напрацьовані зразки кДНК перевіряли з використанням праймерної системи Aiv Н7 (Eu) до Європейського генотипу методом класичної ПЛР.

При створенні плазмідного контролю в якості вектора використовували вектори «Zero Blunt PCR Cloning Kit» виробництва фірми «Invitrogen», США та синтетичний вектор pUC19с, наданий співробітниками Національного інституту генетики (м. Ята, Японія) [2]. Для вбудовування ПЛР продукту в плазмідну форму проводили легування за допомогою набору «Zero Blunt PCR Cloning» Reagent виробництва фірми «Invitrogen», США. Трансформацію плазмідної ДНК проводили за допомогою набору «Rapid DNA Transformation Kit» виробництва фірми «Fermentas» США. Для вирощування трансформованих колоній *E. coli* використовували тверде

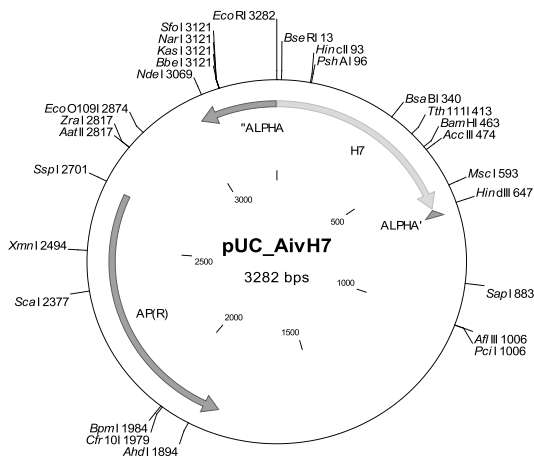
селекційне середовище м'ясо-пептонний агар (МПА) та рідке – LB середовище (Лурія-Бертані). Для виділення плазмідної ДНК з *E. coli* застосовували набір «Мініпреп» виробництва фірми «Алмабіон», м. Вороніж, Російська Федерація.

Результати досліджень. На першому етапі нашої роботи були застосовані два плазмідних вектори pUC19 та pCR-Blunt.

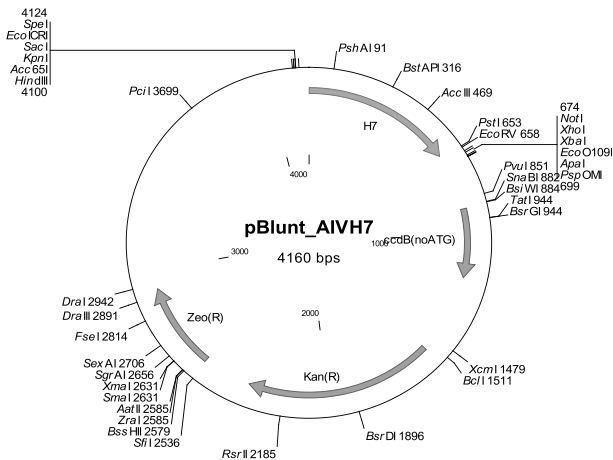
Плазміда pUC19 довжиною 2686 п.н. вміщує ген стійкості до ампіциліну – оперон *E. coli*; ген *lacI*, кодувальний репресор, який контролює репресію гену *LacZ*; полілінкер – коротка послідовність з множинним унікальним сайтом впізнання для ендонуклеаз.

Плазміда pCR-Blunt розміром 3519 п.н. містить у собі гени стійкості до канаміцину та зеоцину; має у своєму складі летальний ген *E. coli* – *ccdB*, це ген плавлення С-краю *lacZα*, а також *Plac* – ген уривання плавлення гену, який дозволяє приєднання лише позитивних рекомбінантних генів.

Для подальшого створення рекомбінантного позитивного контрольного зразка були розраховані векторні молекули на основі обох плазмід (рис. 1).



а. Рекомбінантна ДНК на основі плазмиди pUC19



б. Рекомбінантна ДНК на основі плазмиди pCR-Blunt.

Рис. 1. Плазмідні вектори із вбудованою ділянкою НА-гену вірусу грипу Н7 Європейського генотипу

Але збірку векторної конструкції було вирішено проводити на основі комерційного рCR-Blunt вектора, який на відміну від рUC19 вектора, має тупі кінці, а отже не потребує рестрикції та спеціальної підготовки вбудованого фрагмента.

На наступному етапі роботи були напрацьовані ділянки НА-гену вірусу грипу субтипу Н7 Європейського генотипу з довжиною 641 п.н. (рис. 2) за допомогою раніше створеною ПЛР-методики.

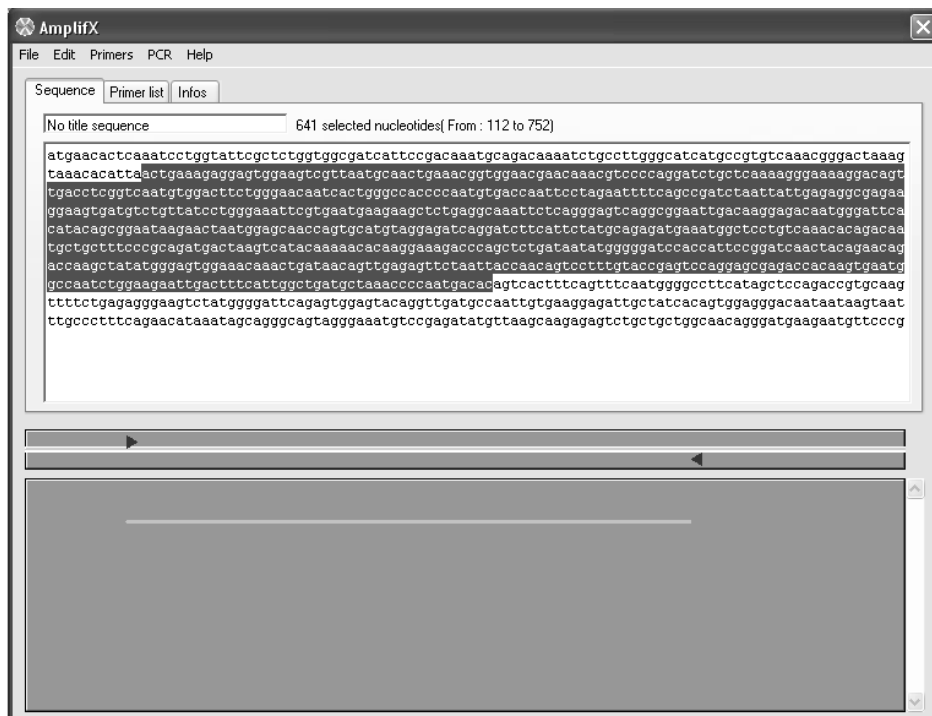


Рис. 2. – Послідовність праймерної ділянки НА-гену вірусу грипу Н7 Європейського генотипу.

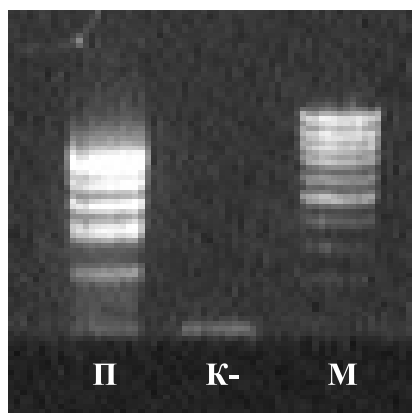
Напрацювання ділянки НА-гена вірусу грипу Н7 проведено на моделі кДНК штаму Н7N1 S.021 Польща 2007, яку ампліфікували за допомогою Taq, Pfi та FinnZyme (Mix) полімерази. Найбільш ефективне накопичення специфічної ділянки відбувалося при застосуванні Pfi – полімерази.

Наступним етапом наших досліджень було проведення ТА-лігіювання для вбудовування продукту ПЛР до плазміди.

ТА-лігіювання проводили з використанням екстрагованих очищених проб ПЛР і відкритого плазмідного вектора рCR-Blunt (25 ng) у присутності Т4 ДНК-лігази (4 U/ml) за температури 16 °C впродовж 1 години.

Після проведення ТА-лігіювання та накопичення бактеріальної маси нам необхідно було ввести рекомбінантну ДНК до бактеріальної клітини. Для цього була проведена трансформація бактерій молекулами плазмідної ДНК шляхом хімопарації при застосуванні хлористого кальцію.

Після висіву та 16-годинної інкубації трансформованих клітин колонії, які вирости на твердому селекційному середовищі перенесли до рідкого LB середовища, з додаванням канаміцину. З отриманими колоніями провели ПЛР для скринінгу ефективності трансформації. При первинному скринінгу канаміцин-резистентних колоній були отримані негативні результати. У зв'язку з цим ПЛР-протокол був оптимізований через збільшення тривалості та температури денатурації матриці. Отримані результати супроводжувалися неспецифічними проявами, про що свідчить наявність набору смуг різної довжини на електрофореграмі (рис. 3).



Ри. 3. Результати електрофоретичного аналізу.

П – дослідна проба; К- – негативний контроль; М – маркер молекулярної ваги.

Для усунення неспецифічного прояву реакції було оптимізовано протокол проведення ампліфікації за методом Touch-Down (табл. 1), при цьому використовували набір фірми Finnzymes та систему праймерів Aiv_H7_Eu_F/R.

Таблиця 1 – Протокол проведення ампліфікації.

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95° С	12 хв.	1
2	95° С	45 сек.	2
	62° С	45 сек.	
3	72° С	1 хв.	2
	95° С	45 сек.	
	60° С	45 сек.	
4	72° С	1 хв.	2
	95° С	45 сек.	
	57° С	45 сек.	
5	72° С	1 хв.	25
	95° С	45 сек.	
	54° С	45 сек.	
6	72° С	5 хв.	1
7	10° С	пауза	

За результатами проведеного дослідження було виявлено присутність амплікону необхідної довжини (641 п.н.) у клоні 3 (рис. 4).

Колонії, які виростили з клітин клону № 3 при пересіві з рідкого середовища, перенесли на тверде (LB-агар). По закінченню доби колонії, котрі виростили на LB-агарі, перенесли до LB-бульйону та інкубували за температури 37 °С впродовж однієї доби.

За результатами проведеного дослідження було виявлено, що всі дослідні проби були позитивними відносно НА-вставки. Утворювані при цьому продукти мали специфічний розмір і ампліфікувались у клітині *E. coli* у великій концентрації (рис. 5).

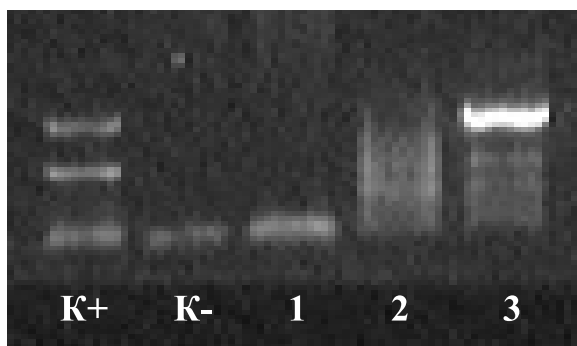


Рис. 4. Результати електрофоретичного аналізу.
К+ – позитивний контроль; К- – негативний контроль; 1,2,3 – дослідні зразки.

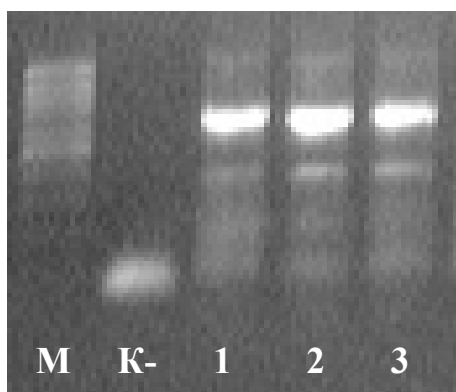


Рис. 5. Результати електрофоретичного аналізу.
М – маркер молекулярної ваги; К- – негативний контроль; 1,2,3 – дослідні зразки.

Отриману плазмідну ДНК заморозили за температури – 20° С для подальшого використання в якості позитивного контролю при діагностиці грипу птиці субтипу Н7 з використанням методики виявлення РНК Європейського генотипу високопатогенного грипу птиці субтипу Н7 за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

При серійних пасажах клону № 3 на LB-середовищах стабільність рекомбінантної ділянки НА-гена показана принаймні у 6 наступних пасажах, що характеризує отриманий клон як біотехнологічно прогресивний.

Висновки. 1. Розроблено модель рекомбінантної плазмиди, що складається з рCR-Blunt відкритого вектора та вставки ділянки гена НА високопатогенного грипу птиці субтипу Н7 Європейського генотипу довжиною 641 п.н.

2. Отримано стабільний клон № 3 Е. coli штаму ДН 5а, що інтродукує фрагмент гена НА вірусу грипу субтипу Н7, який може бути використаний як позитивний контроль при постановці полімеразної ланцюгової реакції для ідентифікації цього збудника.

Список літератури

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение [Текст]: учебник/Б. Глик, Дж. Пастернак: пер. с англ. – М.: Яковский; М.: Мир, 2002. – с.589.
2. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors // Gene 33 (1) 1985, 103-119.
3. Вирусные болезни животных [Текст]: В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. - М.: ВНИТИБП, 1998.
4. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome [text] / R.A. Fouchier, P.M. Schneeberger, F.W. Rozendaal et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2004. – Vol. 101. – P. 1356–1361.
5. Мейнелл, Г. Бактериальные плазмиды [Текст]: пер. А англ. – М.: Зограф, Никифорова; М.: Мир, 1976.

– с.237. 6. «Diseases of poultry» 10-th edition, edited by [text]: B.W. Calnek with H. John Barnes, Charles W. Beard, Larry R. McDougald, Y.M. Saif. Iowa State University Press, Ames, Iowa USA, 1998. – 1024 p.

DEVELOPMENT OF POSITIVE SAMPLE CONTROL OF H7 AVIAN INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ GENE WITH EUROPEAN VIRAL GENOTYPE BY RECOMBINANT DNA

Gerilovich A.P., Simonenko S.I., Bolotin V.I., Solodyankin A.S.

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”,
Kharkov

In this study the plasmid, as the positive control of highly pathogenic H7 Avian influenza virus A European genotype for PCR-diagnostics was developed. The optimal type of vector was selected and the methods of isolation and purification of plasmid DNA were optimized. It was shown that the obtained recombinant control sample is high species-specific and stability for the long-term keeping. Further investigations will be carried out on development of plasmid control for H7 Avian influenza American genotype diagnostics.

УДК 579

ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ ДОСТУПА К ГЕНЕТИЧЕСКИМ РЕСУРСАМ

Головач Т.Н.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАНУ, г. Киев

Доступ к биоматериалам на разных стадиях исследования (скрининг, изоляция, изучение свойств, патентование, коммерциализация) не достаточно урегулирован. Наряду с патентным законодательством, «Боннские руководящие принципы к Конвенции ООН о биоразнообразии» являются важным шагом к решению правовых и экономических аспектов доступа к генетическим ресурсам и их использованию.

Развитие ветеринарной медицины, биотехнологии, микробиологии базируется на использовании разнообразного биологического материала. Стратегическое и народнохозяйственное значение биоресурсов все больше возрастает в национальных и глобальных масштабах, однако вопросы сохранения национальных генетических ресурсов и создания условий для их рационального использования еще недостаточно осознаются как органами государственной власти, так и обществом. Сегодня идет переоценка важности коллекций с точки зрения новых знаний в области генетики и отход от традиционно пренебрежительного отношения к проблемам их функционирования и нормативного регулирования.

Проблема доступа к генетическим ресурсам достаточно сложная и связана с нормами этики и биоэтики, биобезопасности (санитарно-эпидемиологические требования, токсико-гигиенические оценки, экосистемные риски и оценка их воздействий на биоразнообразие), процедур ввоза-вывоза и экспортного контроля (таможенные, карантинные правила). В определенных случаях такой доступ регламентируется нормами Всемирной организации торговли – *Соглашение по торговым аспектам прав интеллектуальной собственности (TRIPS)*, и Всемирной организации интеллектуальной собственности (ВОИС) - *Будапештский договор о международном признании депонирования микроорганизмов с целью патентной процедуры, Биотехнологическая директива ЕС 44/98.*

Патентное законодательство регулирует доступ к объектам интеллектуальной собственности. Согласно с ним коммерческое использование биоматериалов разрешает только патентовладелец, однако для научных исследований депозит открыт. Национальные патентные законодательства разных стран решают проблему допуска к депонированным образцам микроорганизмов/биоматериалов и установления ограничений на их распространение и использование по-разному. Основные ограничения действуют до выдачи патента. После указанного события образец де-