



(51) МПК
C12N 15/49 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015124620/10, 23.06.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 23.06.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 23.06.2015

(45) Опубликовано: 27.08.2016 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SUAREZ DL et al, PCR diagnosis of the bovine immunodeficiency-like virus, *Methods Mol Biol.*, v.92, pp.67-79. RU 2009130342 A, 20.02.2011.

Адрес для переписки:

410012, г. Саратов, Театральная пл., 1, ФГБОУ
 ВО "Саратовский государственный аграрный
 университет имени Н.И. Вавилова", патентный
 отдел

(72) Автор(ы):

Красникова Екатерина Сергеевна (RU),
 Ларионова Ольга Сергеевна (RU),
 Красников Александр Владимирович (RU),
 Утанова Гуля Хайлятдиновна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Саратовский государственный
 аграрный университет имени Н.И. Вавилова"
 (RU)

(54) НАБОР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ПРОВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, СОДЕРЖАЩИЙ ПАРУ СПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНД, И СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биохимии. Описан набор для выявления ДНК провируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV (bovine immunodeficiency virus)), содержащий пару специфичных праймеров и ДНК-зонд, методом ПЦР в режиме реального времени. Праймеры и зонд имеют следующий нуклеотидный состав (5'-3'): pf - TAGGGTAGTGGGATCTCAGAAATC, rg - ACATCCGTAACATCTCCTACCATC, z - GAGGATGGTAGGAGATGTTACGGAT. В качестве источника флуоресценции на 5' конце зонда применяют краситель ROX, а для тушения флуоресценции на 3' конце ВНҚ2. Также описан способ диагностики BIV методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора по п. 1. Реакционную смесь готовят путем смешения буфера 10-кратного для ПЦР - 2,5 мкл, ДНТФ (25 мМ) - 0,2 мкл, праймеров pf и rg (10 пмоль/мкл) по 1 мкл, зонда z (10 пмоль/мкл) - 0,5 мкл, Таq

полимеразы (5 ед./мкл) - 0,2 мкл, MgCl₂ (50 мМ) - 2 мкл, бидистиллированной воды - 7,6 мкл, а амплификацию проводят в следующем режиме: денатурация 95°C - 5 мин, циклирование: денатурация (95°C - 20 с) - отжиг (55°C - 20 с) - элонгация (72°C - 20 с), причем цикл денатурация - отжиг - элонгация повторяется 10 раз, циклирование 2 с детекцией: денатурация (95°C - 20 с) - отжиг (55°C - 20 с) - элонгация (72°C - 20 с), причем цикл денатурация - отжиг - элонгация повторяется 25 или 30 раз. Флуоресценцию измеряют по каналу Orange при температуре 55°C. Пересечение кривой флуоресценции линии threshold, установленной на уровне 30% от максимального уровня флуоресценции в последнем цикле амплификации, свидетельствует о наличии в образце провируса BIV, причем, чем меньше значение показателя «Сt», тем выше количество провируса BIV в исследуемом образце,

в то время как отсутствие пересечения кривой флуоресценции линии threshold свидетельствует об отсутствии провируса ВІV в образце. Изобретение может быть использовано в научных

исследованиях для обнаружения генетического материала ВІV в лимфоцитах крови животных методом ПЦР в режиме реального времени. 2 н.п. ф-лы, 6 ил., 3 табл., 2 пр.

RU 2 5 9 5 3 7 3 C 1

RU 2 5 9 5 3 7 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 15/49 (2006.01)*C12Q 1/68* (2006.01)*C12Q 1/70* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2015124620/10, 23.06.2015**(24) Effective date for property rights:
23.06.2015

Priority:

(22) Date of filing: **23.06.2015**(45) Date of publication: **27.08.2016** Bull. № 24

Mail address:

410012, g. Saratov, Teatralnaja pl., 1, FGBOU VO
"Saratovskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet
imeni N.I. Vavilova", patentnyj otdel

(72) Inventor(s):

**Krasnikova Ekaterina Sergeevna (RU),
Larionova Olga Sergeevna (RU),
Krasnikov Aleksandr Vladimirovich (RU),
Utanova Gulya KHajlyatdinovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Saratovskij gosudarstvennyj
agrarnyj universitet imeni N.I. Vavilova" (RU)**

(54) KIT FOR DNA DETECTION OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY PROVIRUS CONTAINING A PAIR OF SPECIFIC PRIMERS AND PROBE AND DIAGNOSTIC TECHNIQUE FOR CATTLE IMMUNODEFICIENCY VIRUS BY POLYMERASE CHAIN REACTION IN REAL TIME

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry. Described is kit for DNA detection of bovine immunodeficiency provirus (BIV (bovine immunodeficiency virus)), containing pair of specific primers and DNA-probe, by PCR in real time. Primers and probe have following nucleotide composition (5'-3'-): pf - TAGGGTAGTGGGATCTCAGAAATC, pr - ACATCCGTAACATCTCCTACCATC, z - GAGGATGGTAGGAGATGTTACGGAT. Source of fluorescence at 5' end of the probe used is dye ROX and fluorescence quenching fluorescence on 3' end of BHQ2. Also described is diagnostic technique for BIV by PCR in real time using kit according to claim. 1. Reaction mixture is prepared by mixing buffer 10-fold for PCR - 2.5 mql, dNTP (25 mM) is 0.2 mql, pf and pr primers (10 pmol/mql) by 1 mql, probe z (10 pmol/mql) is 0.5 mql, Taq polymerase (5 units/mql) is 0.2 mql, MgCl₂ (50 mM) is 2 mql, bidistilled water is 7.6 mql, and amplification is carried out as follows:

denaturation 95°C is 5 minutes, cycling: denaturation (95°C - 20 s) - annealing (55°C - 20 s) - elongation (72°C - 20 s), wherein cycle of denaturation-annealing-elongation is repeated 10 times, cycling 2 with detection: denaturation (95°C - 20 s)-annealing (55°C - 20 s)-elongation (72°C - 20 s), wherein cycle denaturation-annealing-elongation is repeated 25 or 30 times. Fluorescence is measured over a Orange channel at temperature of 55°C. Intersection of fluorescence curve line threshold, set at level of 30% of maximum level of fluorescence in last cycle amplification testifies to provirus BIV presence in sample, at that, the less value of "Ct" indicator, the higher amount of provirus BIV in analysed sample, while absence of intersection of fluorescence curve line threshold testifies to absence of provirus BIV in sample.

EFFECT: invention can be used in scientific research for detecting genetic material BIV in animal blood lymphocytes by PCR in real time.

2 cl, 6 dwg, 3 tbl, 2 ex

Изобретение относится к области биотехнологии, молекулярной биологии, молекулярно-генетической диагностики вирусных болезней животных и может быть использовано в научных исследованиях для обнаружения генетического материала провируса иммунодефицита крупного рогатого скота - BIV (bovine immunodeficiency virus) в лимфоцитах крови животных методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-time PCR).

Вирусный иммунодефицит крупного рогатого скота (ВИ КРС) - инфекционное заболевание, характеризующееся латентным течением и неизбежно приводящее к летальному исходу. В настоящее время не существует средств специфической терапии и профилактики этой инфекции. Следовательно, своевременная диагностика является единственным способом контроля над распространением данного заболевания.

Возбудитель инфекции принадлежит к семейству Retroviridae, подсемейству Orthoretrovirinae, роду Lentivirus (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>).

Вирус является лимфотропным и повреждает, в первую очередь, иммунную систему: тканевый и гуморальный иммунитет (Bhatia S, Patil SS, Sood R Bovine immunodeficiency virus: a lentiviral infection // Indian J Virol. 2013 Dec; 24(3):332-41. doi: 10.1007/s13337-013-0165-9. Epub 2013 Sep 27). У животных, больных иммунодефицитом, часто возникают поражение центральной нервной и лимфоидной системы (лимфоидная фолликулярная гиперплазия и дисплазия лимфатических узлов), различные вторичные инфекции и опухолевые процессы - развивается синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), что ведет к снижению массы тела, потере продуктивности и получению некачественной продукции животноводства (Snider TG, Hoyt PG, Coats KS, Graves KF, Cooper CR, Storts RW, Luther DG, Jenny BF Natural bovine lentiviral type 1 infection in Holstein dairy cattle. Clinical, serological, and pathological observations // Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2003 Mar; 26(2):89-101).

Молодняк, полученный от больных коров, также может быть инфицирован, так как вирус передается внутриутробно или заражение происходит алиментарно, при выпаивании молоком от больных коров и контактно при совместном содержании (Meas S, Usui T, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds // Vet Microbiol. 2002 Jan 23; 84(3):275-82). Вакцинация BIV-инфицированных телят с целью профилактики других инфекционных заболеваний малоэффективна, поскольку вирус иммунодефицита избирательно поражает и разрушает центральное звено иммунной системы (CD4-лимфоциты), что приводит к снижению иммунного ответа. BIV-инфицированные телята в большей степени подвержены заболеваниям различной этиологии, а именно респираторным, кишечным и другим вирусным и бактериальным инфекциям, грибковым и инвазионным заболеваниям (Carpenter S, Vaughn EM, Yang J, Vaccam P, Roth JA, Wannemuehler Y Antigenic and genetic stability of bovine immunodeficiency virus during long-term persistence in cattle experimentally infected with the BIV(R29) isolate // J Gen Virol. 2000 Jun; 81(Pt 6):1463-72).

Зарубежные исследователи сообщают о широкой распространенности BIV в мире (Bhatia S, Patil SS, Sood R Bovine immunodeficiency virus: a lentiviral infection // Indian J Virol. 2013 Dec; 24(3):332-41. doi: 10.1007/s13337-013-0165-9. Epub 2013 Sep 27).

По некоторым данным распространение BIV в Московской области составляет от 11 до 67%, а в Ставропольском крае 11-33% (Колотвин В.В. Выявление вируса иммунодефицита крупного рогатого скота в Московской области / В.В. Колотвин, А.В. Капитонов, Н.Ф. Гриненко, Л.М. Пискарева, Г.В. Пашвыкина, С.С. Абакин, Г.О. Шайхаев, А.Д. Альтштейн, А.Ф. Валихов // Российский ветеринарный журнал

(сельскохозяйственные животные). - М., - 2006. - №2. - С. 18-20).

Геном ВІV имеет размер 8,48 kb и содержит три основных структурных гена, кодирующих вирусные протеины в следующем порядке: 5'-gag-pol-env-3': ген gag кодирует белки, формирующие «сердцевину» вируса; ген pol-ферментную систему вируса (обратную транскриптазу; интегразу и рибонуклеазу); ген env определяет способность вируса выходить за пределы клетки и инфицировать другие. Жизненный цикл ВІV включает несколько последовательных фаз: связывание вириона с рецептором клетки хозяина: слияние вирусной оболочки и клеточной мембраны; эндоцитоз; обратное транскрибирование; интеграция с геномом хозяина. На этом этапе, провирусной ДНК, вирус может задержаться на несколько лет, делая зараженный организм латентным источником инфекции. При этом вирусная популяция увеличивается за счет клонирования инфицированных клеток. Затем наступает этап репликации: интегрированный провирус транскрибируется клеточной РНК полимеразой и, после сборки капсида, вирионы высвобождаются из клетки почкованием (Супотницкий М.В. Эволюционная патология. К вопросу о месте ВИЧ-инфекции и ВИЧ/СПИД-пандемии среди других инфекционных, эпидемических и пандемических процессов. - Москва: Вузовская книга, 2009. - 400 с).

В настоящее время, для диагностики ВИ КРС в Российской Федерации не существует сертифицированных тест-систем и официально утвержденных инструкций. В мировой практике имеется ряд тестов для выявления как самого ВІV, так и вирус специфичных антител.

Известен способ диагностики вирусного иммунодефицита КРС вирусологическим методом, основанный на культивировании ВІV на фетальных культурах клеток селезенки и легкого КРС или кролика с последующей индикацией и идентификацией вируса (Van Der Maaten MJ, Boothe AD, Seger CL. Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis. J Natl Cancer Inst. 1972; 49:1649-1657; Guo HY, Ma YG, Gai YM, Liang ZB, Ma J, Su Y, Zhang QC, Chen QM, Tan J. Bovine HEXIM1 inhibits bovine immunodeficiency virus replication through regulating VTat-mediated transactivation. Vet Res. 2013; 44(1):21. doi: 10.1186/1297-9716-44-21; Suarez DL, Van Der Maaten MJ, Wood C. Isolation and characterization of new wild type isolates of bovine lentivirus. J Virol. 1993; 67:5051-5055).

Недостатками данного метода являются длительность, трудоемкость и необходимость использования биологических моделей.

Известен способ выявления антител к ВІV в крови животных методом твердофазного иммуноферментного анализа, основанный на обнаружении специфического комплекса антиген-антитело с помощью цветной реакции вследствие ферментации субстрата энзимом, связанным с конъюгатом (Abed Y, Archambault D. A viral transmembrane recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine immunodeficiency virus infection. J Virol Methods. 2000; 85:109-116. doi: 10.1016/S0166-0934(99)00161-5; Bhatia S, Gangil R, Gupta DS, Sood R, Pradhan HK, Dubey SC. Single chain fragment variable antibody against the capsid protein of bovine immunodeficiency virus and its use in ELISA. J Virol Methods. 2010; 167:68-73. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.03.012).

Недостатком метода является невысокая информативность на ранних этапах заражения, когда в крови недостаточно высокий уровень антител и ложноположительные результаты в случае обследования молодняка вследствие наличия в крови кластральных антител.

Известен способ выявления провирусной ДНК ВІV методами классической полимеразной цепной реакции (ПНР) и гнездовой ПЦР (Suarez DL, Whetstone CA. PCR diagnosis of the bovine immunodeficiency-like virus. Methods Mol Biol. 1998; 92:67-79;

Колотвин В.В. Вирус иммунодефицита крупного рогатого скота: индикация инфекции и распространенность в хозяйствах Российской Федерации: Автореферат диссертации канд. биол. наук. М., 2007. - 18; Suarez DL, Van der Maaten MJ, Whetstone CA. Improved early and long-term detection of bovine lentivirus by a nested polymerase chain reaction test in experimentally infected calves. Am J Vet Res. 1995; 56(5):579-586). Данные методы основаны на прямом обнаружении генома провируса ВІV в лимфоцитах крови КРС.

Недостатками данных способов являются:

- повышенный риск контаминации образцов, реактивов, помещения и оборудования лаборатории в момент манипуляции с ампликами при проведении дополнительного цикла амплификации и детекции результатов методом электрофореза в агарозном геле;
- не полное использование возможностей ПЦР, таких как максимальная специфичность и скорость проведения реакции;
- субъективность в интерпретации результатов;
- невозможность количественной оценки при учете результатов.

Наиболее близким к заявленному изобретению является способ, описанный в патенте RU №2499054 от 11.10.2012 г., опубликован 20.11.2013 г., бюл. №32. В данном изобретении выбор специфических праймеров и зондов проводили с помощью компьютерных программ на основании анализа нуклеотидных последовательностей референтных штаммов и изолятов, опубликованных в GenBank, а обнаружение генома вируса осуществляли путем проведения ПЦР в реальном времени с применением олигонуклеотидных праймеров и гибридационного TaqMan ДНК-зонда, несущего флуорофор и тушител, и комплементарного части амплифицируемого со специфическими праймерами фрагмента. При этом праймеры и зонд имели следующий нуклеотидный состав (5'-3'-): 14/2/qf GCT GTC GGG TAT AGG TAG GA; 14/2/z FAM - GTG AAC GTG GGG TCA TCT TCA C - BHQ1; 14/2/qr ACG TGT CCG ATG CTG СТА ТС. В качестве источника флуоресценции на 5' конце зонда применяли краситель FAM, а для тушения флуоресценции на 3' конце ВНQ1. Для проведения ПЦР в режиме реального времени в отдельной пробирке готовили общую реакционную смесь на необходимое количество образцов, для этого на одну пробу добавляли 8 мкл смеси для ПЦР, 7 мкл смеси праймеров и 0,2 мкл (1 ед) Таq-полимеразы, смесь перемешивали, избегая образования пены, и раскапывали по 15 мкл в пробирки объемом 0,2 см, на поверхность смеси вносили воск в объеме 15 мкл, на воск наносили по 10 мкл исследуемого образца. Реакцию осуществляли в следующем режиме:

1. Удержание температуры 95°C - 3 мин
 2. Циклирование 95°C - 10 с
60°C - 20 с
72°C - 15 с
Цикл повторить 5 раз
 3. Циклирование с детекцией 2
95°C - 10 с
60°C - 20 с - Детекция
72°C - 15 с
Цикл повторить 40 раз
- Флуоресценцию измеряли по каналу Green при температуре 60°C.

Но данный способ не может быть использован для выявления провируса иммунодефицита КРС из-за неспецифичности праймеров и зонда для ВІV, а проведение реакции обратной транскрипции (ОТ) перед постановкой ГЦР увеличивает материальные и временные затраты на постановку анализа и усиливает риск

возникновения контаминации в лаборатории.

Технической задачей является разработка быстрого, высокоспецифичного и чувствительного количественного способа обнаружения ДНК провируса иммунодефицита КРС методом ПНР в реальном времени путем конструирования набора, содержащего пару специфичных олигонуклеотидных праймеров и ДНК-зонд, а также подбора условий для проведения ПНР с ними, обеспечивающего минимальный риск контаминации в лаборатории при проведении анализа, а также исключающего субъективность при оценке результатов ПЦР.

Технический результат предлагаемого изобретения заключается в конструировании специфических олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зонда, комплементарных консервативной области генома ВІV, и разработке способа их применения в Real-time PCR, что обеспечивает максимальную чувствительность, специфичность и скорость проведения реакции, минимизацию возможности контаминации образцов, реактивов, помещения и оборудования лаборатории образующимися ампликонами, а также полную объективность и количественный анализ полученных данных за счет автоматического учета результатов.

На фигуре 1 представлена схема строения генома ВІV, размещенная на web-ресурсе NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=bovine+immunodeficiency+virus>).

На фигуре 2 представлен отчет работы прибора Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd., Австралия) и результаты проведения Real-time PCR с применением разработанных праймеров и зонда при моделировании реакционной смеси и определений условий амплификации.

На фигуре 3 представлен отчет работы прибора Rotor-Gene 6000 и результаты проведения Real-time PCR с применением разработанных праймеров и зонда при определении чувствительности способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.

На фигуре 4 представлен график из отчета работы прибора Rotor-Gene 6000 при определении специфичности способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.

На фигуре 5 представлен график из отчета работы прибора Rotor-Gene 6000 при использовании Real-time PCR для выявления ДНК провируса ВІV в крови КРС с применением разработанных специфических олигонуклеотидных праймеров и зонда.

На фигуре 6 представлен отчет работы прибора Rotor-Gene 6000 и результаты проведения Real-time PCR при выявлении ДНК провируса ВІV в лимфоцитах крови КРС с использованием разработанных специфических олигонуклеотидных праймеров и зонда.

Техническая задача решается, а технический результат достигается путем конструирования специфических праймеров и зонда с помощью компьютерных программ на основании анализа нуклеотидных последовательностей референтных штаммов и изолятов, опубликованных на ресурсе GenBank (<http://vrvvm.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/9626219?report=genbank>) и подбора условий для проведения ПЦР в реальном времени с применением разработанных праймеров и зонда, несущего флуорофор и тушитель, и комплементарного части амплифицируемого со специфическими праймерами фрагмента. При этом праймеры и зонд отличаются тем, что имеют следующий нуклеотидный состав (5'-3'-): pf - TAGGGTAGTGGGATCTCAGAAATC, pr - ACATCCGTAACATCTCCTACCATC, z - GAGGATGGTAGGAGATGTTACGGAT, в качестве источника флуоресценции на 5' конце зонда применяют краситель ROX, а для тушения флуоресценции на 3' конце ВНQ2. Для проведения ПЦР в режиме реального времени в

отдельной пробирке готовят общую реакционную смесь на необходимое количество образцов, которая отличается тем, что на одну пробу берут буфер 10-кратный для ПЦР - 2,5 мкл, дНТФ (25 мМ) - 0,2 мкл, праймеры pf и pr (10 пмоль/мкл) по 1 мкл, зонд z (10 пмоль/мкл) 0,5 мкл, Taq полимеразу (5 ед./мкл) - 0,2 мкл, MgCl₂ (50 мМ) - 2 мкл,

5 бидистиллированную воду - 7,6 мкл. Смесь перемешивают, избегая образования пены, раскапывают по 15 мкл в пробирки объемом 0,2 см. На поверхность смеси вносят воск в объеме 15 мкл и на воск наносят по 10 мкл исследуемого образца. Постановка реакции отличается тем, что ее осуществляют в следующем режиме (для Rotor-Gene 6000):

1. Удержание температуры 95°C - 5 мин
- 10 2. Цитирование 95°C - 20 с
55°C - 20 с
72°C - 20 с
Цикл повторить 10 раз
3. Циклирование с детекцией 2
- 15 95°C - 20 с
55°C - 20 с - Детекция
72°C - 20 с
Цикл повторить 25 или 30 раз

20 Флуоресценцию измеряют по каналу Orange при температуре 55°C.

При этом отсутствует необходимость проводить реакцию ОТ.

Конструирование пары синтетических олигонуклеотидных праймеров и зонда, применяемых для выделения ДНК провируса иммунодефицита КРС, и разработка способа диагностики ВИ КРС с их использованием осуществлялись в семь этапов.

1. Анализ структуры генома ВІV.
- 25 2. Конструирование праймеров и зонда.
3. Подбор оптимальной пары праймеров и зонда.
4. Моделирование состава реакционной смеси способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.
5. Отработка условий способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной
- 30 пары праймеров и зонда.
6. Определение чувствительности способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.
7. Определение специфичности способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.

- 35 1. Анализ структуры генома ВІV.

С помощью компьютерной программы Vector NTI 11 (Invitrogen, США) проводили анализ структуры генома референтного штамма Bovine immunodeficiency virus и фрагментов генома ВІV, размещенных на web - ресурсе NCBI, с целью выявления наиболее консервативного участка, которым оказался ген gag (316...1746 п. н.) (фиг.

40 1).

2. Конструирование праймеров и зонда.

С помощью компьютерной программы GENERUNR 3.0, геном вируса в формате FASTA применяли для подбора специфических олигонуклеотидов на участке gag (316...1746 п. н.), как наименее вариабельного для ВІV.

- 45 3. Подбор оптимальной пары праймеров и зонда.

Проверку качества и термодинамический анализ выбранных праймеров выполняли с помощью программы OLIGO DNA/RNA primer analysis software, v.5.0. (http://molbiol-tools.ca/molecular_biology_freeware.htm#Primer%20design) и BLAST (<http://>

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). При дизайне праймеров и зонда основными требованиями были: степень гомологии (комплементарность) с выбранным участком гена; отсутствие самокомплементарных участков внутри олигонуклеотидов и комплементарности друг другу, чтобы не допускать возникновения устойчивых вторичных структур (димеров); близость значений температуры отжига праймеров; выбор температуры отжига зонда на 10°C выше, чем праймеров.

На основании проведенного компьютерного анализа была подобрана пара праймеров и зонд, характеристики которых приведены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика разработанных олигонуклеотидов

Показатель	Прямой праймер (pf)	Обратный праймер (pr)	Зонд (z)
Структура от 5' к 3'	TAGGGTAGTGGG ATCTCAGAAATC	ACATCCGTAACA TCTCCTACCATC	(ROX)GAGGATG GTAGGAGATGT TACGGAT(BHQ2)
Длина, нукл.	24	24	25
T отжига, °C	55,0	55,0	65,0
Локализация в геноме, нукл.	1380...1403	1516...1539	1513...1537
3'-end dG, kcal/mol	-5,1	-5,3	-7
Dimers dG, kcal/mol	0,3	2,8	2,8
GC состав, %	45,8	45,8	48
Длина амплифицируемого фрагмента, п.н.	160		-
Канал учета сигнала при детекции	-		Orange

Разработанные олигонуклеотиды имеют оптимальные размер (24-25 пл.), структуру, о чем свидетельствуют показатели энергии Гиббса на 3' конце (3'-end dG): -5 и -7 kcal/mol и энергии Гиббса димерных структур (Dimers dG): 0,3 и 2,8 kcal/mol, и GC состав (45,8 и 48%), температуру отжига праймеров 55°C, температуру отжига зонда 65°C.

4. Моделирование состава реакционной смеси способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.

Нуклеиновые кислоты (НК) из стабилизированных ЭДТА проб периферической

крови КРС выделяли методом нуклеосорбции на силикогеле с использованием набора «ДНК-сорб-В» (ИнтерЛабСервис, Россия). ПЦР проводили в объеме реакционной смеси - 25 мкл на 1 пробу. Состав реакционной смеси представлен в таблице 2.

Таблица 2

Состав реакционной смеси

Компоненты	Объем на 1 реакцию (25 мкл), мкл
Буфер 10-и кратный для ПЦР	2,5
дНТФ (25 мМ)	0,2
Праймер pf (10 пмоль/мкл)	1
Праймер pr (10 пмоль/мкл)	1
Зонд z (10 пмоль/мкл)	0,5
Полимераза Taq (5 ед./мкл)	0,2
MgCl ₂ (50 мМ)	2
Вода (бидистиллированная)	7,6
Проба ДНК	10

Состав реакционной смеси подбирали таким образом, чтобы концентрация ионов MgCl₂ была в пределах 1,5- 4 мМ, что обеспечивает оптимальную скорость и точность работы фермента Taq-полимеразы, концентрация дНТФ - не более 0,4 мМ, концентрация праймеров - 10 пмоль/мкл и объем пробы - 10 мкл. Перед нанесением пробы ДНК, во избежание образования неспецифических фрагментов, на поверхность смеси вносили 1-2 капли расплавленного воска для ПЦР, чтобы разделить реакционную смесь и исследуемый образец.

5. Отработка условий способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.

Отработку условий ПЦР с использованием разработанных олигонуклеотидов осуществляли на амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd., Австралия). Температурно-временной режим проведения ПЦР представлен в таблице 3.

Таблица 3

Температурно-временной режим проведения ПЦР

Этап	Т, °С	Время, сек.	Кол-во повторов
Начальная денатурация	95	300	1
Циклирование	Денатурация	95	20
	Отжиг	55	20
	Элонгация	72	20
Циклирование 2 с детекцией	Денатурация	95	20
	Отжиг (детекция)	55	20
	Элонгация	72	20

Флуоресценцию измеряют по каналу Orange (возбуждение 589 нм, излучение 605 нм) при температуре 55°C на втором циклировании. При учете результата threshold (порог) устанавливали вручную на уровне 30% от максимального уровня флуоресценции в последнем цикле амплификации. Уровень threshold составил 0,05. Значения показателя «Ст» были на уровне 24-25. В положительных образцах кривая флуоресценции пересекает линию threshold и, в зависимости от интенсивности сигнала, возвышается над линией более или менее. В отрицательных образцах и отрицательном контроле флуоресценции не наблюдается, что отражается прямой детекции на уровне или ниже линии threshold (фиг. 2).

6. Определение чувствительности способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.

Положительные пробы ДНК использовали в качестве позитивного контроля при определении чувствительности метода. Учитывая высокую чувствительность метода ПЦР в реальном времени, из очищенных проб ДНК, полученной из инфицированных ВИ лимфоцитов крови КРС, готовили разведения 10^{-3} и 10^{-4} . Пробы исследовали методом Real-time PCR с применением разработанных специфических олигонуклеотидов. Во всех разведениях кривая флуоресценции пересекала линию threshold и возвышалась над ней. В разведении 10^{-3} показатель «пороговый цикл» («Ст») составил 18, для 10^{-4} - 25 (фиг. 3).

7. Определение специфичности способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.

Специфичность разрабатываемого способа проверяли на гомологичных и гетерологичных образцах: провирусная ДНК ВIV, ВLV (вирус энзоотического лейкоза КРС), FIV (вирус иммунодефицита кошек), FeLV (вирус лейкемии кошек), а также образцах от интактных животных. Положительный результат в ПЦР был получен только с образцом ДНК, содержащими ВIV, при отсутствии кривой флуоресценции с другими пробами и в отрицательном контроле (фиг. 4).

Пример 1. Применение Real-time PCR для выявления ДНК провируса иммунодефицита

КРС с использованием разработанных специфических олигонуклеотидных праймеров и зонда при исследовании периферической крови КРС.

Для анализа методом ПЦР были взяты 32 пробы периферической крови от коров (с. Озерное Саратовская обл.), признанных больных энзоотическим лейкозом на основании серологических и гематологических исследований, так как по литературным данным у таких животных наиболее часто выявляется ВИ КРС. В качестве контроля использовали очищенную ДНК крови ВІV-позитивных животных. В процессе ПЦР в 10 пробах были получены кривые флуоресценции, пересекающие линию threshold, при отсутствии таковой в отрицательном контроле. Это свидетельствует о воспроизводимости результатов проведенных опытов (фиг. 5).

Пример 2. Применение реакции амплификации для выявления ДНК провируса иммунодефицита КРС в лимфоцитах крови, с использованием разработанных специфических олигонуклеотидных праймеров и зонда.

Для анализа методом ПЦР были взяты 6 проб лимфоцитов крови КРС находящегося в частном владении и подозрительного в заражении ВІV, в том числе у трехнедельной телочки, полученной от ВІV-позитивной коровы. В процессе ПЦР во всех 6 пробах были получены кривые флуоресценции, пересекающие линию threshold, при отсутствии таковой в отрицательном контроле. Значения показателя «Сt» составило от 18 до 24. Это свидетельствует о воспроизводимости результатов проведенных опытов (фиг. 6).

Предложенные набор и способ диагностики позволяют количественно выявлять на ранних стадиях высоко консервативную область гена gag ВИ КРС. Применение олигонуклеотидного зонда позволяет повысить чувствительность и специфичность способа, исключить субъективность при оценке результатов. Использование предлагаемой модификации ПНР позволяет значительно снизить возможность контаминации образцов, помещения, оборудования и реактивов, а также сократить сроки проведения анализа, что важно как для владельцев животных, так и для ветеринарных специалистов.

Предложенный способ диагностики и набор для его реализации апробированы с положительными результатами и регулярной воспроизводимостью этих результатов в 2015 году на 32 пробах периферической крови и 6 пробах лимфоцитов крови, полученных от КРС, подозрительного в заражении ВІV.

Работу проводили на базе межкафедральной учебно-научно-исследовательской лаборатории «Геном» ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ» и ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов).

Формула изобретения

1. Набор для выявления ДНК провируса иммунодефицита крупного рогатого скота, содержащий пару специфичных праймеров и ДНК-зонд, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, отличающийся тем, что имеют следующий нуклеотидный состав (5'-3'-):

pf - TAGGGTAGTGGGATCTCAGAAATC,

pr - ACATCCGTAACATCTCCTACCATC,

z - GAGGATGGTAGGAGATGTTACGGAT,

в качестве источника флуоресценции на 5' конце зонда применяют краситель ROX, а для тушения флуоресценции на 3' конце ВНQ2.

2. Способ диагностики вирусного иммунодефицита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием набора для выявления ДНК провируса иммунодефицита крупного рогатого скота по п. 1,

отличающийся тем, что реакционную смесь готовят путем смешения буфера 10-кратного для ПЦР - 2,5 мкл, дНТФ (25 мМ) - 0,2 мкл, праймеров рf и рg (10 пмоль/мкл) по 1 мкл, зонда z (10 пмоль/мкл) - 0,5 мкл, Taq полимеразы (5 ед./мкл) - 0,2 мкл, MgCl₂ (50 мМ) - 2 мкл, бидистиллированной воды - 7.6 мкл, а амплификацию проводят в следующем режиме:

денатурация 95°C - 5 мин,

циклирование: денатурация (95°C - 20 с) - отжиг (55°C - 20 с) - элонгация (72°C - 20 с), причем цикл денатурация - отжиг - элонгация повторяется 10 раз,

циклирование 2 с детекцией: денатурация (95°C - 20 с) - отжиг (55°C - 20 с) - элонгация (72°C - 20 с), причем цикл денатурация - отжиг - элонгация повторяется 25 или 30 раз, при этом флуоресценцию измеряют по каналу Orange при температуре 55°C, и пересечение кривой флуоресценции линии threshold, установленной на уровне 30% от максимального уровня флуоресценции в последнем цикле амплификации, свидетельствует о наличии в образце вируса ВIV, причем, чем меньше значение показателя «Сt», тем выше количество вируса ВIV в исследуемом образце, в то время как отсутствие пересечения кривой флуоресценции линии threshold свидетельствует об отсутствии вируса ВIV в образце.

20

25

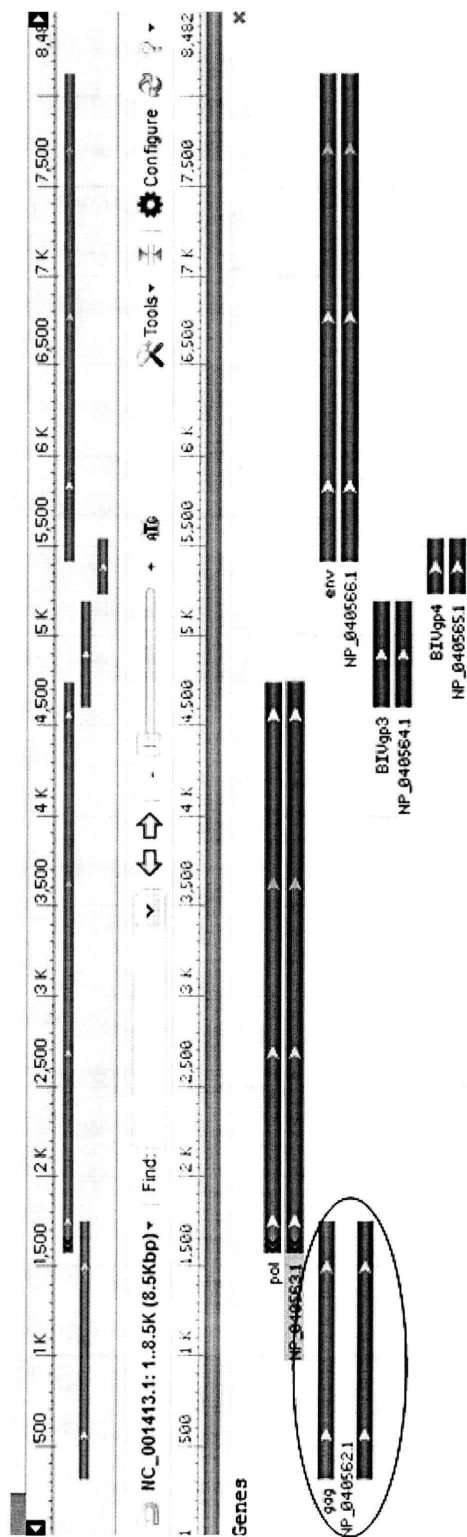
30

35

40

45

СПЕЦИФИЧНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ПРОВИРУСА
 ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СПОСОБ
 ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО
 СКОТА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ
 РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ



Фиг. 1

СПЕЦИФИЧНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК
ПРОВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И
СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ



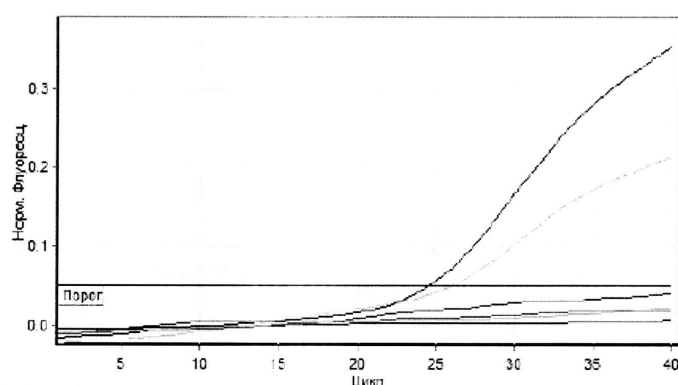
14 Hilly Street Mordialloc NSW 2117 Australia
T +61 2 9758 1520
F +61 2 9756 1164
W www.corbettlifescience.com

Количество. Отчёт

Информация о тесте

Название Теста	Тест 2015-04-10 (2)
Начало Теста	10.04.2015 15:10:02
Тест Закончен	10.04.2015 16:36:06
Оператор	
Замечания	
Тест. выполнен программой версии	Rotor-Gene 1.8.17.5
Подпись Теста	Подпись Теста правильна.
Уровень сигнала Orange	8,

Количество. данные для Cycling A. Orange



№	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта (Копии)	Конц. Расч. (Копии)	Коефф. Вариации %	Сред. Ст
1	K-	Образец					
2	BIV1	Образец	25,95				25,95
3	BIV2	Образец	24,51				24,51
4	BIV3	Образец					
5	BIV4	Образец					
6	BIV5	Образец					

Легенда:

ОТР (ПФ) - Образец удалён из рассмотрения из-за значения ПФ порога.

NEG (Эфф-ть) - Образец удалён из рассмотрения так как его эффективность меньше чем порог эффективности реакции.

Фиг. 2

СПЕЦИФИЧНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК
ПРОВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И
СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО
ВРЕМЕНИ



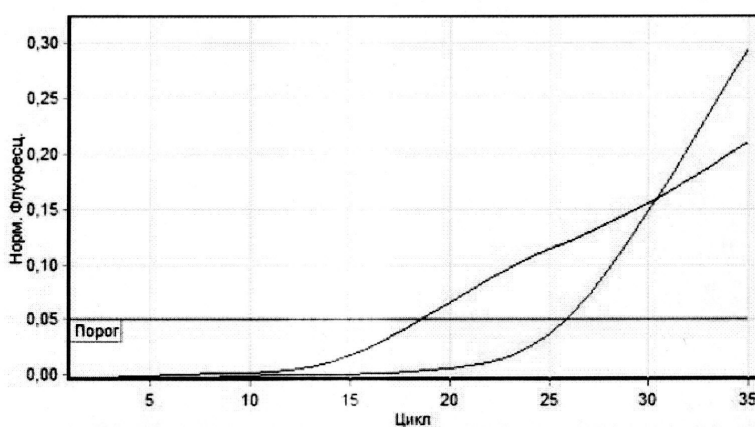
14 Hilly Street Mortlake NSW 2137 Australia
T + 61 2 9736 1320
F + 61 2 9736 1364
W www.corbettlifescience.com

Количество. Отчёт

Информация о тесте

Название Теста	Bru dif 2015-04-09 (1)
Начало Теста	09.04.2015 17:00:55
Тест Закончен	09.04.2015 18:28:53
Оператор	
Замечания	
Тест. выполнен программой версии	Rotor-Gene 1.8.17.5
Подпись Теста	Подпись Теста правильна.
Уровень сигнала Orange	9,33

Количество. данные для Cycling A.Orange



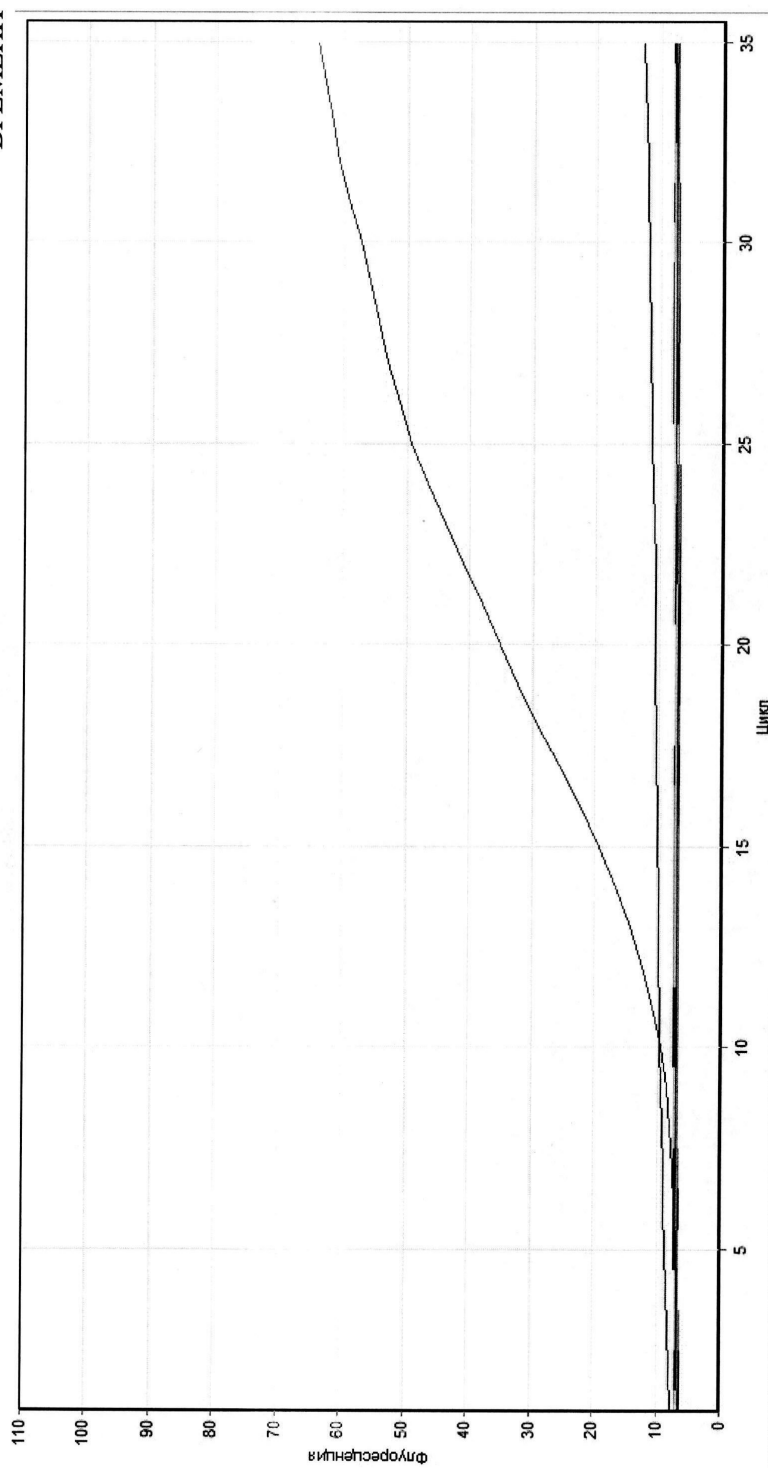
№	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта (Копии)	Конц. Расч. (Копии)	Козфф. Вариации %	Сред. Ct
35	10 ⁻³	Образец	18,58				22,19
36	10 ⁻⁴	Образец	25,80				

Легенда:

OTR (ПФ) - Образец удалён из рассмотрения из-за значения ПФ порога.

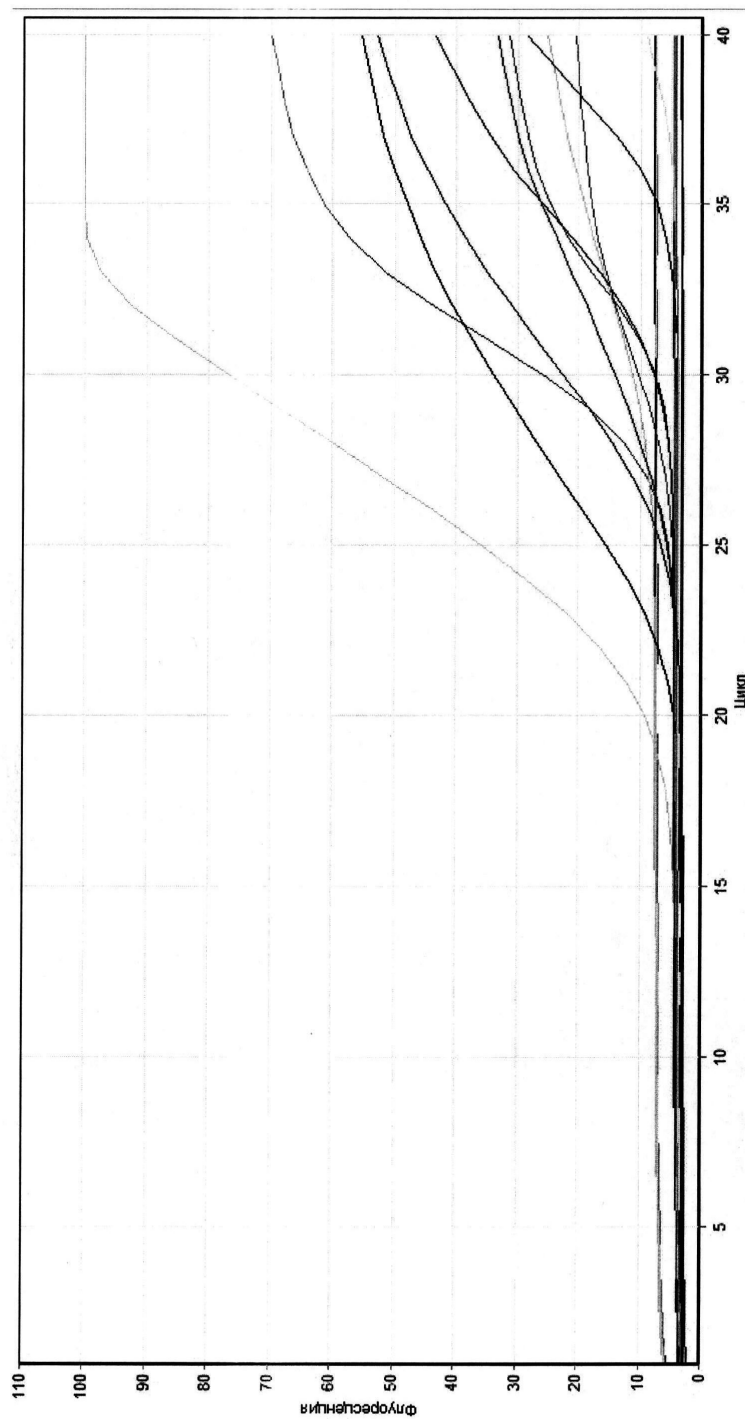
NEG (Эфф-ть) - Образец удалён из рассмотрения так как его эффективность меньше чем порог эффективности реакции.

СПЕЦИФИЧНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ПРОВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ



Фиг. 4

СПЕЦИФИЧНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ПРОВИРУСА
ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ
ВИРУСНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ



Фиг. 5

СПЕЦИФИЧНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК
ПРОВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И
СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ



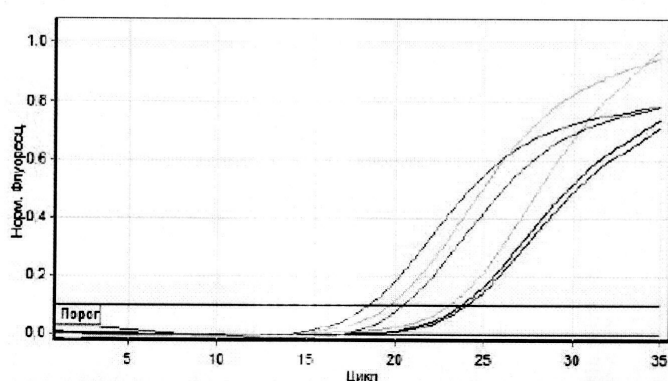
14 Hilly Street Morristown NSW 2137 Australia
T +61 2 9756 4320
F +61 2 9756 1164
W www.corbettresearch.com

Количество. Отчёт

Информация о тесте

Название Теста	Amplisens Influenza virus AB-FL 2015-02-10 (2)
Начало Теста	10.02.2015 16:53:07
Тест Закончен	10.02.2015 18:13:23
Оператор	
Замечания	
Тест. выполнен программой версии	Rotor-Gene 1.8.17.5
Подпись Теста	Подпись Теста правильна.
Уровень сигнала Orange	10.

Количество. данные для Cycling A.Orange



№	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта (Копии)	Конц. Расч. (Копии)	Козфф. Вариации %	Сред. Ст
1	К-	Образец					
2	BIV1	Образец	23,12				23,12
3	BIV2	Образец	23,85				23,85
4	BIV3	Образец	24,13				24,13
5	BIV4	Образец	19,75				19,75
6	BIV5	Образец	20,51				20,51
7	BIV6	Образец	18,57				18,57

Легенда:

ОТР (ПФ) - Образец удалён из рассмотрения из-за значения ПФ порога.

NEG (Эфф-ть) - Образец удалён из рассмотрения так как его эффективность меньше чем порог эффективности реакции.

Фиг. 6