



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

1

(21) 4356796/13
(86) РСТ ЕР 88/00123 19.02.88
(22) 19.10.89
(31) Р 3705512.7
(32) 20.02.87
(33) DE
(46) 07.02.92. Бюл. № 5
(72) Др. Ренате Зеелинг, Проф. Др. Ханс
Петер Зеелинг (DE) Др. Жан Буркхард (CH)
(53) 575.224.2; 577.2/048(088.8)
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДНК ДЛЯ ДИАГ-
НОСТИКИ Hu-A, Hu-B-ГЕПАТИТА
(57) Изобретение относится к медицине и
может быть применено для диагностики за-
болевания Hu-A, Hu-B-гепатита. Способ
получения ДНК для диагностики Hu-A- Hu-
B-гепатита заключается в том, что осущест-

2

вляют стерилизацию суспензии кала путем
фльтрации ее через миллипоровый фильтр
размером около 0,22 мкм осаждают поли-
этиленгликолем 6000 при конечной концен-
трации 10%, отделяют осадок, растворяют
его в буфере, встряхивают с фреоном в со-
отношении 1:1, отделяют фреоновую фазу,
осаждают ПЭГ 6000 при конечной концен-
трации 10%, обрабатывают РНК- и ДНК-
азой, фракционируют в градиенте
хлористого цезия, отделяют фракции с плот-
ностью 1,3 г/мл, диализуют, обрабатывают
полученную фракцию протеиназой К, экстра-
гируют 80%-ным фенолом и хлороформом,
обрабатывают ДНК рестриктазой EcoRI,
клонировать фрагмент ДНК в плазмиде pRR
322 или в лямбда-фагах.

Изобретение относится к медицине и
может быть применено для диагностики за-
болевания Hu-A, Hu-B-гепатита.

Предложен способ получения ДНК, пре-
дусматривающий предварительную стерили-
зацию суспензии кала путем фильтрации
ее через миллипоровый фильтр размером
около 0,22, осаждение полиэтиленгликолем
(ПЭГ 6000) при конечной концентрации
10%, отделение осадка, растворение его в
буфере, встряхивание с фреоном в соотно-
шении 1:1, отделение фреоновой фазы,
осаждение ПЭГ 6000 при конечной концен-
трации 10%, обработку РНК-азой и ДНК-
азой, фракционирование в градиенте
хлористого цезия, отделение фракции с
плотностью 1,3 г/мл, диализ, обработку по-
лученной фракции протеиназой К, экстра-
кцию 80%-ным фенолом и хлороформом,

обработку ДНК рестриктазой Eco R1, клони-
рование фрагмента ДНК в плазмиде pBR322
или в лямбда-фагах.

Пример 1. Выделение ассоциирован-
ного с Hu-A, Hu-B-гепатитом вещества из
кала пациентов.

Используемый буфер: трис-HCl, pH 7,4,
0,05 н. во всех стадиях работ.

а) Обработка: 0,5 г кала суспендируют в
10 мл буфера, центрифугируют при 8000g и
собирают надосадочную жидкость. Остаток
промывают еще раз с помощью 10 мл и
затем 5 мл буфера. Собранные надосадоч-
ные жидкости центрифугируют (30 мин,
10000 об/мин) и фильтруют через непрони-
цаемый для бактерий фильтр (около 0,22
миллипор). Надосадочную жидкость осаж-
дают с помощью ПЭГ 6000 (конечная кон-
центрация 10%, соответственно, 0,4

моль/л). Спустя 2–12 ч осадок отделяют центрифугированием и растворяют в 10 мл буфера. Этот раствор встряхивают с 10 мл фреона, фазы разделяют путем центрифугирования, фреоновую фазу еще раз промывают 5 мл буфера. Повторяют осаждение с помощью ПЭГ и NaCl (конечная концентрация 10%, соответственно 0,4 моль/л). Осадок обрабатывают примерно 800 мкл буфера.

Полученный раствор переваривают с РНК- и ДНК-азой в течение 1 ч при 37°C и наносят на градиенты хлористого цезия.

б) В пробирки для центрифугирования вносят 1 мл раствора хлористого цезия с плотностью 1,4 г/мл и сверху в каждую по 3 мл раствора с плотностью 1,3, 1,25 и 1,2 г/мл. Все растворы готовят на указанном буфере. На градиенте наслаивают 800 мкл экстракта кала, центрифугируют 65–72 ч при 10°C (31000 об/мин). Затем собирают фракции нижней области градиента (плотность 1,4–1,4 г/мл) примерно по 200 мкл, в верхней области с плотностью 1,1–1,2 г/мл можно отбирать большие фракции. Плотность каждой фракции определяется путем измерения показателя преломления. Все фракции диализируют и по 50 мкл каждой фракции исследуют по NANB-анализу на ассоциированное с Hu-A, Hu-B-гепатитом вещество. В положительных фракциях определяют концентрацию белка.

Идентификация и характеристика вещества.

в) Приготовление градиентных полос.

Продиализированные и возможно сконцентрированные фракции градиента хлористого цезия смешивают с 10 мкл SDS, 10 мкл глицерина и 5 мкл бета-меркаптоэтанола, 5 мкл бромфенового синего на 100 мкл пробы и кипятят 3 мин на водяной бане. Затем их смешивают с 5 мкл 0,1%-ного раствора пиронина и наносят на градиентный полиакриламидный гель. Продолжительность 3,5 ч, напряжение 160–300 В, сила тока 40–25 А, мощность 20 Вт.

Примерно за 5 мин до окончания электрофореза еще раз наносят 5 мкл пиронина и заканчивают операцию, как только пиронин пройдет через гель. Гель либо окрашивают с помощью серебра, либо осуществляют блоттинг в течение ночи при 0,5 А, затем 1 ч при 1 А.

г) Блоттинг-анализ.

По окончании блоттинга различные полосы (выделенные пирониновыми маркерами) вырезают и в сопровождении стандарта молекулярного веса окрашивают амидо-черным. Полосы с пробами встряхивают в течение 24–72 ч в 1%-ном

растворе желатины в PBS. IgG-фракция пациента, соответственно Fab-2-фрагменты этой IgG-фракции маркируют с помощью иода-125 (хлорамин Т): 0,5 мкг на 100 мкг протеина. При этом инкорпорируются примерно 70% активности. Радиоактивный индикатор, объем которого соответствует примерно 2 мкг протеина, разбавляют в 20 мл желатины в PBS и затем полосы инкубируют при встряхивании в течение 12 ч. После этого полосы промывают по 1 ч 3 раза с помощью желатины-PBS, 2 раза с помощью PBS-Твин 0,5%-ный и 1 раз водой. После высушивания полос их накладывают на чувствительную рентгеновскую пленку и экспонируют при -70°C в течение 2–7 дней.

Пример 2. Метод обнаружения ассоциированного с HNANB вещества в кале.

Полистирольные шарики вместе с сывороткой выздоровевших пациентов, болевших Hu-A, Hu-B-гепатитом, в разбавлении 1:200 в карбонатном буфере, pH 9,2, 0,01 моль/л, инкубируют 12 ч при комнатной температуре, шарики промывают забуференным фосфатом физиологическим раствором хлорида натрия (PBS). Пробы кала в форме 10%-ной суспензии кала инкубируют 2 ч при 37°C с покрытыми, как указано, шариками из полистирола, после чего обильно промывают с помощью PBS, который содержит 0,5% Твина-20, и затем инкубируют при 37°C в течение 1 ч с человеческим IgG из сыворотки выздоровевших от Hu-A- Hu-B-гепатита, которая маркирована иодом-125. После промывки дистиллированной водой связанную с шариками радиоактивность подсчитывают на гамма-счетчике. Пробы кала, в которых связанная радиоактивность достигает трехкратного значения отрицательного контроля, считают положительными на наличие ассоциированного с Hu-A, Hu-B-гепатитом вещества.

Установлено, что положительную реакцию обнаруживают в пациентов с Hu-A, Hu-B-гепатитом, что применение этого анализа у большого числа пациентов с массой совершенно различных заболеваний печени, которые, не имеют ничего общего с Hu-A, Hu-B-гепатитом, вещество, если вообще находят его, находят только в очень низком процентном содержании.

Во время исследования коллективов пациентов с гепатитом другого генеза либо гепатитом А, либо гепатитом В, ассоциированное с Hu-A, Hu-B-гепатитом вещество находят в очень низком процентном содержании.

Установлено, что пациенты с Hu-A, Hu-B-гепатитом имеют 30% положительных ре-

зультатов, в противоположность чему в случае подозрения на гепатит А, гепатит В и постгепатит В у пациентов это число значительно ниже.

Пример 3. Выделение ДНК из кала и клонирование ДНК-последовательностей.

Из кала пациентов с Нu-A, Нu-B-гепатитом, как описано в примере 1, выделяют ассоциированные с Нu-A, Нu-B-гепатитом частицы, как там описано, обрабатывают и очищают через градиенты хлорида цезия и диализуют. Диализованные фракции исследуют на наличие ассоциированного с NANВ вещества описанным образом. Фракцию плотности 1,3 г/мл в градиентах хлорида цезия переваривают с 50 мкг протеиназы К, 1% SDS и ЭДТА в конечной концентрации 10 mM в течение 6 ч при 37°C. Протеины удаляют путем экстракции с помощью 80%-ного фенола (вес/объем) и хлороформа, и после этого растворенную в водной фазе ДНК в присутствии 0,3 М ацетата натрия осаждают с помощью двух с половиной кратного объема этанола в течение 60 ч при -70°C. Затем центрифугируют и осадок промывают один раз с помощью 70%-ного этанола, высушивают и после этого обрабатывают ТЕ-буфером, состоящим из 10 ммоль/л Трис, pH 3, и 1 mM ЭДТА, в объемном соотношении 1 мкл/5 мг обработанного кала.

15 мкл этого основного раствора ДНК инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре в общем реакционном объеме 50 мкл с 6 единицами полимеразы Кленова (ДНК-полимераза 1, большой фрагмент), 1 мкл раствора dATP, dTTP и dGTP, в концентрации 1 mM, а также 5 мкл альфа-32P-dCTP в инкубационном буфере для полимеразы Кленова по данным изготовителя.

После этого добавляют 2,5 мкл 1 mM dCTP-раствора, инкубируют 1 ч при комнатной температуре, прогревают при 68°C в течение 10 мин и охлаждают до 0°C. Затем реакционную смесь вместе с 2 единицами T4-ДНК-лигазы, 1 мкг фосфорилированного EcoR-1-линкера и 6 мкл 10 mM раствора dATP инкубируют в течение 16 ч при 16°C. В реакционной смеси затем устанавливают конечную концентрацию 150 mM NaCl и вместе с 240 единицами EcoR-1-рестрикционной эндонуклеазы (80 ед./мкл) переваривают 3 ч при 37°C. Реакцию прекращают добавлением 5 мкл 80%-ного фенола и 1 мкл 20%-ного SDS. Радиоактивно маркированную и снабженную линкерами ДНК отделяют от соли и нелегированных линкеров через колонку с сефарозой (объем колонки 3 мл, длина 25 см) и осаждают 2,5-кратным объемом этанола в течение 16 ч при -70°C.

Осажденную ДНК центрифугируют 10 мин при 14000 g, осадок промывают 150 мкл 70%-ного этанола, высушивают и обрабатывают 10 мкл ТЕ-буфера.

Пример 4. Клонирование изолированной ДНК в лямбда-фаги и трансфекция на бактерии.

Для лигирования с ДНК-вектором 2 мкг ДНК лямбда-фагов 1149 вместе с 2-мя единицами EcoR-1 (4 ед./мкл) в общем реакционном объеме 6 мкл/инкубационный буфер по данным изготовителя инкубируют 1 ч при 37°C. Затем фермент инактивируют путем 10-минутного нагревания при 68°C. Этот раствор лигируют с 3 мкл маркированной ДНК, которая выделена как описано в примере 3, 1 мкл 5 mM ATP и 1 ед. T4-ДНК-лигазы при комнатной температуре. 4 мкл этой реакционной смеси упаковывают в оболочки лямбда-фагов. Этими упакованными фагами инфицируют штамм *Escherichia coli* NM514. Для скрининга на наличие встроенной ДНК примерно 10⁵ фагов наносят на пластины для скрининга размером 22x22 см и инкубируют в течение ночи при 37°C. ДНК-фаги переносят на фильтр из нитроцеллюлозы путем отпечатка, фильтр гибридизируют с 1 мкл описанного радиоактивного основного раствора ДНК, промывают и ауторадиографируют 6 ч при -70°C.

Из 70 положительных сигналов гибридизации выбирают 17 подчиненных колоний фагов при плотности примерно 5 тромбоцитов на 1 см². После очистки тромбоцитов готовят 16 положительных клонов, которые содержат ДНК-вставки длиной от 0,3 т.п.о. до примерно 1,5 т.п.о. и гибридизируют с пробой первоначального основного раствора ДНК.

Пример 5. Характеристика ДНК-фрагмента длиной 0,45 т.п.о. и субклонирование этого фрагмента в плазмиду pVC19 в *Escherichia coli*.

ДНК-фрагмент удаляют из ДНК фагов путем переваривания эндонуклеазой EcoR1 при описанных условиях. Фрагмент отделяют на агарозо-геле от ДНК лямбда-фагов, из геля вырезают соответствующие вставки ДНК-полосы и элюируют. Изолированную ДНК-вставку вносят путем лигирования в ДНК-вектор pVC19 и после этого трансфицируют в штамм H 1 *Escherichia coli*. После селекции штаммов бактерий осуществляют выращивание наработку штамма.

Вставку радиоактивно маркируют и испытывают путем анализа по Соузерну на гибридизацию с исходным материалом, экстракциями из калов контрольных лиц, вирусом гепатита и плазмидой PBR 322.

Пример 6. Обнаружение ассоциированной с Hu-A, Hu-B-ДНК в сыворотке.

2–5 мл сыворотки центрифугируют при 150000 g в течение 2 ч. Осадок переваривают при 37°C в течение 1 ч в 200 мкл раствора протеиназы К (0,5 мг/мл, 10 mM ЭДТА), к раствору добавляют 165 мкл горячего насыщенного раствора иодида натрия (2,5 г иодида натрия/мл H₂O, 75°C) до конечной концентрации 12,5 M, нагревают 10 мин при 90°C и фильтруют непосредственно через нитроцеллюлозный фильтр под вакуумом. После фильтрации нитроцеллюлозную пленку промывают 3 раза 70%-ным этанолом и затем 10 мин при комнатной температуре инкубируют в 100 мл уксусного ангидрида (100 мл, 0,1 M триэаноламина, 250 мкл уксусного ангидрида). После инкубации пленку обжигают в вакууме при 80°C в течение 1–2 ч. Высушенную пленку вносят в раствор предварительной гибридизации, инкубируют 3 ч при 65°C (6xSSC), 1 x Denhardt, 0,5% SDS, где 20 x SSC (стандартный солевой цитрат) соответствует 3M NaCl, 1,5 M цитрат натрия.

SDS – додецилсульфат натрия.

100 x Denhardt – раствор соответствует 2% Ficoll, 2% поливинилпирролидона, 2% бычьего сывороточного альбумина, 20 мкг/мл денатурированной, нагреванием ДНК спермы), инкубируют с 32P-маркированной пробой в течение ночи в условиях прегибридизации. Затем нитроцеллюлозную пленку промывают 3 раза в растворе (1 6xSSC, 1xDenhardt, 0,5% SDS, 20 мкг/мл ДНК-спермы, 1xSSC, 0,5% SDS, 1 x Denhardt, 0,1 x SSC + 0,05% SDS). После высушивания пленки ее накладывают на рентгеновскую пленку на время от 6 ч до 2 дней при 70°C.

Пример 7. Обнаружение Hu-A, Hu-B-ДНК в сыворотке.

200 мкл сыворотки инкубируют с 75 мкл раствора протеиназы К (4 мг/мл) и 25 мкл 0,5 M ЭДТА при 37°C в течение 1 ч, затем добавляют 100 мкл 1 n. NaOH, выдерживают 10 мин при комнатной температуре и нейтрализуют 250 мкл 2M ацетата аммония. 500 мкл смеси (соответственно 181 мкл сыворотки) наносят на нитроцеллюлозу, нейтрализуют 250 мкл 2M ацетата аммония, сушат в вакууме при 80°C в течение 45 мин. Фильтры перегибридизуют в 6 x SSC, 0,5% SDS, 1 x растворе Denhardt и 20 мкл/мл денатурированной (5 мин, 100°C) ДНК спермы при 65°C в течение 3 ч.

Для гибридизации, которую осуществляют в течение ночи в условиях прегибридизации, используют маркированную с помощью 32 P за счет Nick-трансляции

вставку фаговых клонов (удельная активность примерно 1–2 x 10⁹ cpm (мкг ДНК). Фильтры затем, смотря по обстоятельствам, промывают еще раз 20 мин при 65°C с помощью 6 x SSC, 1 x раствором Denhardt, 0,5% SDS, 20 мкг/мл денатурированной ДНК Hering-спермы, затем 1 x SSC, 0,5% SDS, 1 x раствора Denhardt и 0,1 x SSC, 0,05% SDS и высушивают при 80°C. Ауторадиографию осуществляют с помощью рентгеновской пленки и усилительной пленки при времени ауторадиографии 6–48 ч при -70°C.

Пример 8. Подготовка проб для анализа.

1 мл сыворотки с 350 мкл раствора протеиназы К (3 мг/мл протеиназы К, 10 mM Трис, pH 7,5, 0,5 mM ЭДТА, 0,5% SDS) и 125 мкл 0,5 M ЭДТА инкубируют 30 мин при 37°C. Затем раствор разбавляют с помощью 8 мл 2 M TCA (pH 7,0), 3,2 мл 2M ацетата аммония, 20 мкл РНК (10 мг/мл) и 5,3 мл H₂O до 16 мл. ДНК осаждают 10 мл изопропанола при комнатной температуре в течение 30 мин. Осадок ДНК отделяют центрифугированием (15 минут при 8000 об/мин) промывают его 2 мл 70%-ного этанола, растворяют в 600 мкл 10 mM Трис, pH 8,4, и 1 mM ЭДТА, экстрагируют 1 раз фенолом, 1 раз хлороформом и еще раз осаждают. Аликвотные части осажденной ДНК используют для Dot-блоттинг-анализа или для рестрикционного анализа.

Получение ассоциированной с частицами ДНК из проб кала осуществляют таким же образом. Суспензии кала предварительно стерильно фильтруют и осаждают с помощью ПЭГ.

Пример 9. Если имеется относительно мало ассоциированного с Hu-A, Hu-B вещества, то оказывается целесообразным обнаружить ДНК путем амплификации.

Обнаружение Hu-A, Hu-B-ДНК в сыворотке осуществляют путем гибридизации с радиоактивно маркированной клонированной Hu-A, Hu-B-ДНК-пробы после предварительной специфической ферментативной ДНК-амплификации.

25 мкл сыворотки, 50 мкл NaI (насыщенный раствор) смешивают, инкубируют 2 мин при 37°C, после чего инкубируют 10 мин при 0°C. Инкубат диализуют на поликарбонатной мембране против TE-буфера (10 mM Трис, 1 mM ЭДТА) 20 мин. 5 мкл диализата отбирают для специфической ферментативной ДНК-амплификации с помощью по 0,5 мкг олигопраймера (пара А и В, соответственно, С и D). Олигопраймерные пары готовят по известным данным секвенирования посредством ДНК-синтезатора. После амп-

лификации реакционную смесь разделяют электрофоретически на 2%-ном агарозном геле, наносят на нейлоновую мембрану и гибридизуют с маркированной с помощью ^{32}P клонированной Nu-A, Nu-B-ДНК-пробы. После ауторадиографии идентифицируют положительные результаты, руководствуясь стандартом и маркерами. Сопровождающие контроли служат для оценки эффективности, амплификации, как с помощью HBV-специфических праймеров, так и также с помощью специфических к Nu-A, Nu-B-праймеров. Доказательство идентичности находящейся в инфекционной загрузке ДНК с ДНК из кала пациентов с Nu-A, Nu-B-гепатитом говорит об идентификации включенной в Nu-A, Nu-B-гепатит ДНК.

Исследование дальнейших 57 проб кала пациентов со спорадическим и пост-гемотрансфузионным Nu-A, Nu-B с помощью радиоиммуноанализа, как описано в предыдущих примерах, и в Dot-блоттинг-способе, дает замечательную корреляцию обоих способов исследования в отношении обнаруживаемого, ассоциированного с Nu-A, Nu-B-вещества (R 1A) и обнаруживаемой ДНК (Dot-блоттинг, см. пример 7).

ДНК показывает родство с HBV-ДНК. Если клонированный 0,45 кВ фрагмент или очищенный материал кала маркирован ^{32}P и гибридизован в анализе по Соузерну до HBV-ДНК, обе пробы дают сигнал, правда, примерно в 1000 раз слабее, чем сам по себе. Плаزمиды pBR 322 и лямбда-фаги не дают никакого сигнала. В предварительных опытах очищенную пробу кала, без осуществления денатурации, можно очень хорошо маркировать маленьким фрагментом E coli полимеразы.

Обработанная полимеразой Кленова проба кала мигрирует в геле агарозы отчетливо медленнее, чем необработанная проба. Это говорит о том, что исследованная ДНК, также как HBV-ДНК, частично двунилевая. Результаты и обработка рестрикционными ферментами и экстрензия праймера доказывают циркулярную структуру ДНК.

Полученные ДНК, в особенности находящиеся в этих ДНК гены, можно использовать для включения в соответствующие векторы экспрессии, как клетки и бактерии (например E.coli и дрожжи, как Saccharomyces cerevisiae, а также культуры клеток) и для получения вирусных антигенов. Таким образом возможна диагностика и получение иммунореагентов и вакцин. В случае диагностики нужно назвать в особенности исследование на инфекционность (исследование консервированной крови) и диагноз острой, хронической или по времени прошедшей инфекции. Приготовленные в культурах клеток антигены, а также соответствующие, синтезированные благодаря этим вирус-ДНК ин vivo и ин vitro протеины можно использовать для установления иммунологической диагностики. ДНК-последовательность может применяться для идентификации потенциальных вирусных протеинов (белков) и их синтетического получения, следовательно, получения синтетических антигенных пептидов.

Формула изобретения

Способ получения ДНК для диагностики Nu-A, Nu-B-гепатита, заключающийся в предварительной стерилизации суспензии кала путем фильтрации ее через миллипорный фильтр размером пор 0,22 мкм осаждения полиэтиленгликолем 6000 при конечной концентрации 10%, отделении осадка, растворении его в буфере, встряхивании с фреоном в соотношении 1:1, отделении фреоновой фазы, осаждении полиэтиленгликолем 6000 при конечной концентрации 10%, обработке РНК- и ДНК-азой, фракционировании в градиенте хлористого цезия, отделении фракции с плотностью 1,3 г/мл, диализе, обработке полученной фракции протеиназой К, экстракции 80%-ным фенолом и хлороформом, обработке ДНК рестриктазой Eco R 1, клонировании фрагмента ДНК в плазмиде pBR 322 или в лямбда-фагах.

Редактор С.Патрушева

Составитель Т.Забойкина
Техред М.Моргентал

Корректор В.Гирняк

Заказ 351

Тираж

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул.Гагарина, 101