

УДК 619:616.98.578.823.1:577.2

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КОНТРОЛЕЙ
ДЛЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМОВ
ВИРУСОВ БОЛЕЗНЕЙ ШМАЛЛЕНБЕРГ И АКАБАНЕ
МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ
ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

*Никитина Е.Г., аспирант,
Сальников Н.И., кандидат биологических наук, заведующий
лабораторией Арбовирусных инфекций,
Балашова Е.А., кандидат биологических наук, ведущий
научный сотрудник,
Цыбанов С.Ж., доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией Биофизики,
Колбасов Д.В., доктор ветеринарных наук, профессор, директор
ГНУ Всероссийский научно-исследовательский
институт ветеринарной вирусологии и микробиологии
Российской академии сельскохозяйственных наук,
г. Покров*

Ключевые слова: *болезнь Акабана, болезнь Шмалленберг, ПЦР
в реальном времени, положительный контроль, тест-система.*

Аннотация: *Статья посвящена разработке рекомбинантных
положительных контролейк тест-системедля выявления геномов ви-
русов болезней Шмалленберг и Акабана методом мультиплексной ОТ-
ПЦР в реальном времени.*

Введение. Болезни Шмалленберг и Акабана – зоонозные арбовирусные болезни крупного рогатого скота, овец и коз. Возбудители обеих болезней относятся к одной серогруппе Simbu семейства Bunyaviridae рода Orthobunyavirus [1, 2, 3, 4, 5].

Оба вируса распространяются двумя путями: трансмиссивным и трансплацентарным [1, 2, 3, 5].

Болезни Шмалленберг и Акабана вызывают большие экономические потери. Во-первых, это прямые потери от гибели животных. Во-вторых, снижается продуктивность домашних жвачных животных и имеет место нарушение воспроизводительной функции у больных животных.

В-третьих, большой экономический урон наносят ограничения на экспорт сельскохозяйственной продукции, в частности, на торговлю скотом, мясом, шерстью и другими продуктами животного происхождения.

В связи с многообразием экономических, туристических и культурных связей с ближним и дальним зарубежьем не исключается возможность заноса на территорию Российской Федерации возбудителей экзотических инфекций, в том числе болезней Акабана и Шмалленберга, которые в настоящее время широко распространены в странах Европы и Азии [4]. Поэтому необходима разработка эффективных средств экспресс-диагностики.

В настоящее время одним из способов диагностики обеих болезней является выявление вирусного генома методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Главное достоинство метода – очень высокая чувствительность: в результате амплификации концентрация специфической олигонуклеотидной последовательности возрастает в десятки миллионов раз.

В настоящее время в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии разработана тест-система для выявления геномов вирусов болезней Шмалленберга и Акабана методом мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени.

Так как обязательным компонентом любой тест-системы на основе ОТ-ПЦР является положительный контроль, нами были разработаны положительные рекомбинантные контроли.

Материалы и методы. Для получения рекомбинантных плазмид было проведено клонирование амплифицируемых фрагментов геномов вирусов болезней Шмалленберга и Акабана (129 и 113 п.о. соответственно) в клетках *E. coli*, шт. «OneshoutTop10» (Invitrogen, США) в составе плазмидных T – векторов pTZ57R/T (Fermentas, Латвия).

Лигирование векторов с амплифицированными фрагментами геномов вирусов болезней Шмалленберга и Акабана проводили в соответствии с инструкцией к набору InsTAclone™ PCR Cloning Kit.

Полученными рекомбинантными плазмидами трансформировали компетентные клетки методом теплового шока (рисунок 1). Затем трансформированные клетки высевали на агар и после 10 ч инкубации проводили первичный скрининг клонов по цвету колоний: колонии белого цвета содержат рекомбинантную плазмиду, синего цвета – не содержат.

Наработку клонов, содержащих данные плазмиды, проводили, культивируя трансформированные клетки в жидкой среде SOB с ампициллином в течение ночи при 37 °С. Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса с SDS [6].

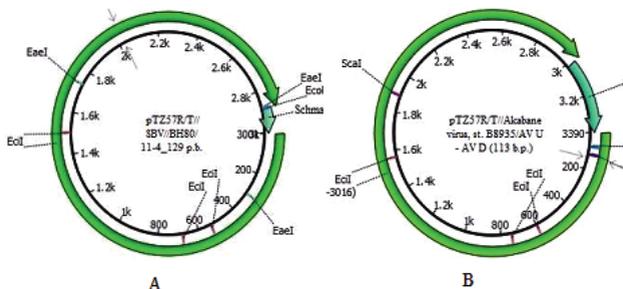


Рисунок 1 - А – Рекombинантная плазмида pTZ57R/T//SBV//BH80/11-4_129 p.b., несущая вставку фрагмента генома вируса болезни Шмалленберг; В – Рекombинантная плазмида pTZ57R/T//Akabanevirus, st. B8935/AVU - AV D (113 b.p.), несущая вставку фрагмента генома вируса болезни Акабане.

Для проверки наличия вставок методом ПЦР использовали по 8 клонов рекомбинантных плазмид pTZ57R/T//SBV//BH80/11-4_129 p.b. и pTZ57R/T//Akabanevirus, st. B8935/AVU - AV D (113 b.p.). В качестве положительных контролей брали РНК указанных вирусов. Результаты ПЦР представлены на рисунке 2.

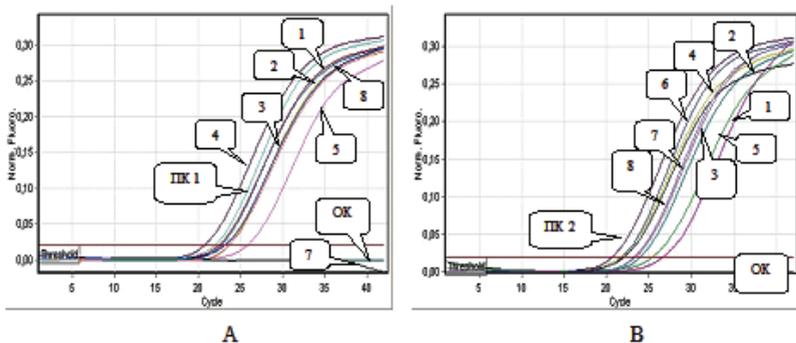


Рисунок 2 - Результаты ОТ-ПЦР. А:1-6 и 8 – клоны, несущие плазмиду pTZ57R/T//SBV//BH80/11-4_129 p.b.; 7 – клон без вставки; В: 1-8 – клоны, несущие плазмиду pTZ57R/T//Akabanevirus, st. B8935/AVU - AV D (113 b.p.); ОК – отрицательный контроль; ПК1 – РНК вируса болезни Шмалленберг; ПК2 – РНК вируса болезни Акабане.

Подбор оптимальной концентрации плазмиды в качестве положительного контроля для постановки ПЦР в реальном времени проводили с использованием десятикратных серийных разведений. Исходные концентрации плазмид pTZ57R/T//SBV//BH80/11-4_129 p.b. и pTZ57R/T//Akabanevirus, st. B8935/AVU - AVD (113 b.p.) составили $4,73 \times 10^9$ и $6,57 \times 10^{10}$ копий ДНК/мкл соответственно.

Предельное разведение плазмиды pTZ57R/T//SBV//BH80/11-4_129 p.b., при котором регистрировали положительный сигнал, содержало $4,73 \times 10^3$ копий ДНК/мкл; а плазмиды pTZ57R/T//Akabanevirus, st. B8935/AVU - AVD (113 b.p.) – $6,57 \times 10^2$ копий ДНК/мкл.

С целью определения рабочих концентраций плазмид нами были проведены экспериментальные исследования, в ходе которых мы установили, что оптимальное разведение плазмиды pTZ57R/T//SBV//BH80/11-4_129 p.b., которое можно использовать в качестве положительного контроля составляет $4,73 \times 10^6$ копий ДНК/мкл; а плазмиды pTZ57R/T//Akabanevirus, st. B8935/AVU - AVD (113 b.p.) – $6,57 \times 10^5$ копий ДНК/мкл.

Выводы. Таким образом, рекомбинантные плазмиды могут быть использованы в качестве положительных контролей «Тест-системе для выявления геномов вирусов болезней Шмалленберг и Акабана методом мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени».

Рабочие концентрации плазмид pTZ57R/T//SBV//BH80/11-4_129 p.b. и pTZ57R/T//Akabanevirus, st. B8935/AVU - AVD (113 b.p.) составляют $4,73 \times 10^6$ и $6,57 \times 10^5$ копий ДНК/мкл соответственно.

Библиографический список:

1. Балашова, Е.А. Разработка средств и методов лабораторной диагностики болезни Акабана: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06/ Балашова Елена Алексеевна; ВНИИВВиМ. – Покров, 1993. – 123 с.

2. Балашова, Е.А. Идентификация вируса болезни Акабана с помощью серологических методов исследований / Е.А. Балашова // – М.: Ветеринария. – 2012, №10. – С. 56-57.

3. Болезни Шмалленберг и Акабана: сходства и различия / Е.Г. Никитина, Н.И. Сальников, Е.А. Балашова, С.Ж. Цыбанов, Д.В. Колбасов // Сельскохозяйственная биология, № 4. – Москва, 2013. – С. 48-52.

4. Контроль персистенции вируса болезни Акабана в культуре клеток Vero с помощью прямого метода иммунофлюоресценции / О.Ю. Котова, Е.А. Балашова, С.Д. Кушнир [и др.] // Научный журнал КубГАУ, № 83. – 2012. – С. 37-46.

5. Хан, Е.О. Идентификация вируса болезни Акабана на основе методов анализа генома: дис. ... канд.биол.наук: 03.02.02/ Хан Евгения Олеговна; ВНИИВВиМ. – Покров, 2013. – 87 с.

6. Sumbrook, J.F. Cold Spring Harbor Laboratory Press / J.F.Sumbrook, D.W. Russell. – Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed.. – 2001. – P. 2100.

CONSTRUCTION OF POSITIVE CONTROLS TO THE TEST SYSTEM TO DETECT THE SCHMALLEMBERG AND AKABANE VIRUSES GENOMES USING BY MULTIPLEX RT-PCR IN REAL TIME

Nikitina E.G., Salnikov N.I., Balashova E.A., Tsybanov S.Zh., Kolbasov D.V.

Keywords: *Akabane virus, Schmallerberg virus, real-time PCR, the positive control, test-system.*

Abstract: *The article is devoted to the development of recombinant positive controls for the test-system to detect of Schmallerberg and Akabane viruses genomes by multiplex RT-PCR.*