ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ

ӨНЕРТАБЫСҚА ПАТЕНТ

АСТАНА

(19) **ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ**

ӨНЕРТАБЫСҚА

(11) **№ 32963**

(12) # ПАТЕНТ

(54) **АТАУЫ:** Құстардың вирусты ауруларын (Ньюкасл ауруы, құс тұмауы, тауықтардың инфекциялы бурситі, құстардың инфекциялы бронхиты) микрочип технологиясының негізінде экспресс-диагностикалау тәсілі

(73) **ПАТЕНТ ИЕЛЕНУШІСІ:** Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің "Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты" шаруашылық жүргізу құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорыны (KZ)

(72) **АВТОР (АВТОРЛАР):** Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна (KZ); Кожабергенов Нурлан Сиязбекович (KZ); Строчков Виталий Михайлович (KZ); Бурашев Ербол Досанович (KZ); Червякова Ольга Викторовна (KZ); Орынбаев Мухит Бармакулы (KZ); Тайлакова Эльмира Талгатовна (KZ); Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич (KZ); Сансызбай Абылай Рысбайұлы (KZ)

(21) **Өтінім №** 2016/0784.1 (22) **Өтінім берілген күн:** 06.09.2016

25.06.2018 Қазақстан Республикасы Өнертабыстардың мемлекеттік тізілімінде тіркелді.

Патентті күшінде ұстау ақысы уақытылы төленген жағдайда, патенттің күші Қазақстан Республикасының бүкіл аумағында қолданылады.

Қазақстан Республикасының
Әділет вице-министрі **Н. Пан**

Өзгерістер енгізу туралы мәліметтер осы патентке қосымша түрінде жеке парақта келтіріледі

003836

(19) **МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

(12) # ПАТЕНТ

(11) **№ 32963**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(54) **НАЗВАНИЕ:** Способ экспресс-диагностики вирусных болезней птиц (болезнь Ньюкасла, грипп птиц, инфекционный бурсит кур, инфекционный бронхит птиц) на основе микрочиповой технологии

(73) **ПАТЕНТООБЛАДАТЕЛЬ:** Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (KZ)

(72) **АВТОР (АВТОРЫ):** Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна (KZ); Кожабергенов Нурлан Сиязбекович (KZ); Строчков Виталий Михайлович (KZ); Бурашев Ербол Досанович (KZ); Червякова Ольга Викторовна (KZ); Орынбаев Мухит Бармакулы (KZ); Тайлакова Эльмира Талгатовна (KZ); Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич (KZ); Сансызбай Абылай Рысбайұлы (KZ)

(21) **Заявка №** 2016/0784.1 (22) **Дата подачи заявки:** 06.09.2016

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан 25.06.2018.

Действие патента распространяется на всю территорию Республики Казахстан при условии своевременной оплаты поддержания патента в силе.

Вице-министр юстиции
Республики Казахстан **Н. Пан**

Сведения о внесении изменений приводятся на отдельном листе в виде приложения к настоящему патенту

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) B (11) 32963
(51) *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/7125 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ

(21) 2016/0784.1
(22) 06.09.2016
(45) 23.07.2018, бюл. №27
(72) Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна; Кожабергенов Нурлан Сиязбекович; Строчков Виталий Михайлович; Бурашев Ербол Досанович; Червякова Ольга Викторовна; Орынбаев Мухит Бармакулы; Тайлакова Эльмира Талгатовна; Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич; Сансызбай Абылай Рысбайұлы
(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан
(56) Султанкулова К.Т., Кожабергенов Н.С., Строчков В.М., Бурашев Е.Д., Червякова О.В., Сандыбаев Н.Т., Сансызбай А.Р. Подбор зондов микрочипа для экспресс-диагностики некоторых вирусных болезней птиц // Известия Национальной Академии наук РК, №6, 2016, с.43-47

Барышников П.И., Новиков Б.В. Серологический мониторинг вирусных инфекций диких птиц в степной области Алтайского края // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки, №7, 2009, с.63-68

Абдылдаева Р.Т., Акматова Э.К., Атамбекова Ж.А., Камарли А.А.С. Диагностика болезни Ньюкасла с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР)//Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2016, №6(140), с.137-141

(54) **СПОСОБ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПТИЦ (БОЛЕЗНЬ НЬЮКАСЛА, ГРИПП ПТИЦ, ИНФЕКЦИОННЫЙ БУРСИТ КУР, ИНФЕКЦИОННЫЙ БРОНХИТ ПТИЦ) НА ОСНОВЕ МИКРОЧИПОВОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

(57) Изобретение относится к биотехнологии, в частности к молекулярной биологии и предназначено для экспресс-диагностики вирусных болезней птиц, как болезнь Ньюкасла, грипп птиц, инфекционный бурсит кур (болезнь Гамбора), инфекционный бронхит птиц одновременно.

Изобретение может быть использовано в ветеринарии и биологии для выявления генетического материала (РНК) вирусов - возбудителей болезней птиц.

Задачей настоящего изобретения является создание нового более быстрого и экономичного способа экспресс-диагностики вирусных болезней птиц, как болезнь Ньюкасла, грипп птиц, инфекционный бурсит кур (болезнь Гамбора), инфекционный бронхит птиц.

Сущность его заключается в создании набора олигонуклеотидных флуоресцентно-меченых зондов, выделении РНК вируса тризольным методом, проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) с одновременным флуоресцентным мечением вирусных кДНК, печатью олигонуклеотидного микрочипа, гибридизацией ампликонов с ДНК-микрочипом, содержащим соответствующие дискриминирующие гибридизационные зонды. Использование этого способа позволяет диагностировать болезнь Ньюкасла, грипп птиц, инфекционный бурсит кур (болезнь Гамбора), инфекционный бронхит птиц в клинических образцах одновременно.

Предлагаемый способ является более эффективным по сравнению с известными тест-системами и методами диагностики РНК-содержащих вирусных инфекций и предназначен для использования в лабораторных и научно-исследовательских учреждениях, занимающихся диагностикой птичьих болезней.

(19) KZ (13) B (11) 32963

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к молекулярной биологии и предназначено для экспресс-диагностики вирусных болезней птиц, как болезнь Ньюкасла, грипп птиц, инфекционный бурсит кур (болезнь Гамбора), инфекционный бронхит птиц. Предлагаемый способ экспресс-диагностики вирусных болезней птиц основан на микрочиповой технологии - созданием набора олигонуклеотидных флуоресцентно-меченых зондов, проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) кДНК вирусов с последующей гибридизацией ампликонов с ДНК-микрочипом, содержащим соответствующие дискриминирующие гибридизационные зонды. Использование этого способа позволяет диагностировать болезнь Ньюкасла, грипп птиц, инфекционный бурсит кур (болезнь Гамбора), инфекционный бронхит птиц в клинических образцах.

Изобретение может быть использовано в ветеринарии и биологии для выявления генетического материала (РНК) вирусов болезни Ньюкасла, гриппа птиц, инфекционного бурсита кур (болезнь Гамбора), инфекционного бронхита птиц одновременно.

В настоящее время для птицеводства Республики Казахстан потенциальную опасность представляют вирусные инфекции, как болезнь Ньюкасла, грипп птиц, инфекционный бурсит кур (болезнь Гамбора), инфекционный бронхит и др. Частые вспышки инфекции в сопредельных государствах повышают риск заноса инфекции на территорию Республики Казахстан. Молекулярные микрочипы повышают качество и скорость анализа в молекулярной диагностике инфекционных болезней и используются в качестве самостоятельного метода при скрининговом анализе большого количества образцов проб патологического материала.

С учетом того что многие инфекционные болезни имеют смешанную этиологию, большое значение придается мультиплексности анализа. Мультиплексность анализа (выявление комплекса параметров) является одним из основных требований, предъявляемых к современным и перспективным методам диагностики.

Экспресс-диагностика вирусных болезней птиц на основе микрочиповой технологии имеет ряд преимуществ - прямое определение РНК возбудителя, высокая специфичность, высокая чувствительность, универсальность процедуры, простота и удобство проведения анализа, сравнительно небольшие затраты времени на проведение анализа. Преимущества делают чип незаменимой при диагностике персистирующих вирусных инфекций, для которых характерны низкие концентрации вируса в тканях и биологических жидкостях организма в латентный период заболевания.

Для осуществления эпидемиологического контроля и прогнозирования эпидемий необходимо иметь высокочувствительные и надежные методы идентификации вирусов.

Существующие в настоящее время методы идентификации вирусов можно разделить на две основные группы.

1 группа - Известны иммуноферментные методы диагностики вирусных болезней птиц:

Для диагностики гриппа птиц:

В настоящее время "золотым стандартом" при определении вируса гриппа является выделение вируса на развивающихся куриных эмбрионах или клеточных культурах с последующей идентификацией иммунологическими методами (иммуноферментный анализ, иммунофлуоресценция) (Stamboulian D., Bonvehi P. E., Nacinovich F. M., Cox N. Influenza Infect. Dis. Clin. North. Am., 2000, v.14, p.141-166). Недостатком метода является повышенная биологическая опасность, трудоемкость и длительное время, требуемое для культивирования (от 3 до 7 дней). Использующиеся культуры клеток поддерживают репликацию ограниченного количества клинически важных вирусов.

Для диагностики гриппа птиц известен тест-набор Anigen AIV Ag (ELISA) - иммуноферментный анализ для качественного определения антигена вируса птичьего гриппа (Avianlnfluenza Virus) типа А в птичьем образце, BioNote, Корея.

Для диагностики болезни Ньюкасла известны:

Тест-набор Anigen NDV Velo Ab (96 wells) (ELISA) иммуноферментный анализ для качественного определения антител велогенных (сильновирулентных) штаммов вируса болезни Ньюкасла (Newcastle DiseaseVirus), BioNote, Корея.

Ricardo Luiz Moro de Sousa, Helio Jose Montassier, and Aramis Augusto Pinto, Detection and Quantification of Antibodies to Newcastle Disease Vims in Ostrich and Rhea Sera Using a Liquid Phase Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Clin Diagn Lab Immunol. 2000; 7(6), 940-944.

Для диагностики инфекционного бронхита птиц известны:

(IBV) Infectious Bronchitis Virus Antibody test kit - to detect antibodies to known IBV strains in chickens, CK119 IBV, BioChek, USA.

De Wit JJ, Mekkes DR, Koch G, Westenbrink F. Detection of specific IgM antibodies to infectious bronchitis virus by an antibody-capture ELISA. Avian Pathol. 1998;27(2): 155-60. doi: 10.1080/03079459808419317.

Для диагностики инфекционного бурсита кур (болезнь Гамбора) известны:

Saravanan P, Satishkumar, Kataria JM, Rasool TJ. Detection of Infectious bursal disease virus by ELISA using an antipeptide antibody raised against VP3 region. Acta Virol. 2004; 48(l):39-45.

The Infectious Bursal Disease Virus Antibody test kit - to detect antibodies to known IBD strains in chickens. CR 113 IBD, BioChek, USA.

2 группа - Известна детекция методом ПЦР в реальном времени вирусных болезней птиц:

Диагностика гриппа птиц:

Ключевым элементом молекулярно-генетических методов является обратная транскрипция, во время которой на матрице РНК синтезируется кДНК,

которую далее амплифицируют с использованием специфических праймеров. Визуализация продуктов амплификации осуществляется с помощью электрофореза, флуоресцентных красителей с детекцией в реальном времени, с использованием микроматриц или методом секвенирования (Gavin P. J., Thompson R. B. Jr. Review of rapid diagnostic tests for influenza. Clin. Appl. Immunol. Reviews, 2003, v. 4, p. 51-172), (Stone B., Burrows J., Schepetiuk S., et al. Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real time PCR. J. Virol. Methods, 2004, v. 117, p. 103-112; Phipps L.P., Essen S.C., Brown I.H. Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. J. Virol. Methods, 2004, v. 122 (1), p.119-122).

Известен тест-набор Anigen AIV A Real-Time PCR (PCR) - детекция вируса птичьего гриппа (Avian Influenza Virus) типа А методом ПЦР в режиме реального времени, BioNote, Корея.

Для диагностики болезни Ньюкасла известны:

Тест-набор Anigen Lento NDV Real-Time PCR (PCR) - детекция лентогенных (слабовирулентных и авирулентных) штаммов вируса болезни Ньюкасла (Newcastle Disease Virus) методом ПЦР в режиме реального времени, BioNote, Корея.

D. Nidzworski, E. Wasilewska, K. Smietanka, B. Szewczyk and Z. Minta. Detection and differentiation of Newcastle disease virus and influenza virus by using duplex real-time PCR. Vol. 60, No 3/2013, 475-480, Acta biochimica Polonica, on-line at: www.actabp.p

Для диагностики инфекционного бронхита птиц известны:

Тест-набор Anigen IBV Real-Time PCR (PCR) - Детекция вируса инфекционного бронхита (Infectious Bronchitis Virus) методом ПЦР в режиме реального времени, BioNote, Корея.

Aylar Saba Shirvan and Karim Mardani. Molecular detection of infectious bronchitis and Newcastle disease viruses in broiler chickens with respiratory signs using Duplex RT-PCR. Vet Res Forum. 2014; 5(4): 319-323.

Для диагностики инфекционного бурсита кур (болезнь Гамбора) известны:

Тест-набор Anigen IBDV Real-Time PCR (PCR) - Детекция вируса инфекционной бурсальной болезни (Infectious Bursal DiseaseVirus) методом ПЦР в режиме реального времени, BioNote, Корея.

Michelle A. Peters, Tsang Long Lin, Ching Ching Wu. Real-time RT-PCR differentiation and quantitation of infectious bursal disease virus strains using dual-labeled fluorescent probes Journal of Virological Methods. Volume 127, Issue 1, July 2005, Pages 87-95.

Одним из существенных недостатков данных тест-систем и методик является необходимость тестирования каждой инфекции отдельно, что значительно усложняет и удорожает стоимость анализа. В связи с этим стала актуальной разработка высокочувствительного теста, позволяющего одновременно выявлять несколько инфекции одновременно с использованием микрочиповой технологии.

Современная диагностика вирусных болезней требует наличия точных и чувствительных методов их измерения. Несмотря на большое число методик, разработанных для диагностики вирусных болезней птиц не все они удовлетворяют требованиям точности, воспроизводимости, доступности, простоты проведения анализа.

Возможность параллельного анализа одного образца на множестве типирующих зондов чрезвычайно важна для диагностики исследуемого микроорганизма. Это позволяет снизить время анализа от нескольких дней или даже недель до нескольких часов.

Внедрение новой методологии, идущей на смену традиционным подходам, наметило следующий шаг в совершенствовании лабораторной вирусологической диагностики - создание микрочипов, которое является одной из современных технологий, основанных на гибридизации нуклеиновых кислот, благодаря которой стала доступной экспресс-диагностика многих особо опасных инфекций, что крайне необходимо для правильного выбора проводимых экстренных ветеринарно-санитарных мер. Данная технология является более информативной и имеет значительные преимущества перед традиционными молекулярно-биологическими методами, так как позволяет миниатюризировать исследуемый образец и анализатор, что значительно снижает стоимость анализа и время его проведения, а также определять различные параметры исследуемого образца, причем без потери чувствительности амплификационных методов.

Микрочип, применяемый для диагностики и идентификации вируса имеет преимущество над иммунологическими методами и ПЦР в реальном времени как более экспрессный и менее затратный метод с возможностью проводить одновременную детекцию порядка десятков образцов в рамках одного эксперимента.

Анализ технологии микрочипов показывает, что чувствительность метода соразмерен таким методам как полимеразная цепная реакция, однако основным преимуществом новой технологии является, во-первых, его миниатюризация диагностических систем, позволяющая на небольшом участке проводить многофункциональные исследования, ну и, конечно, количественная сторона, на одном биочипе можно анализировать сотни проб, одновременно диагностируя болезнь и идентифицируя возбудитель.

Несмотря на чрезвычайную актуальность проблемы, в настоящее время в Республике Казахстан практически нет коммерческих наборов для мультиплексной диагностики вирусных болезней птиц. Вследствие этого данная работа может являться платформой для создания высокопроизводительных систем такого рода.

Предлагаемый способ является более эффективным по сравнению с известными тест-системами и методами диагностики РНК-содержащих вирусных инфекций и предназначен для использования в лабораторных и научно-исследовательских учреждениях, занимающихся диагностикой птичьих болезней.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является создание нового более быстрого и экономичного способа экспресс-диагностики вирусных болезней птиц, как болезнь Ньюкасла, грипп птиц, инфекционный бурсит кур (болезнь Гамбора), инфекционный бронхит птиц.

Эта задача решается новым способом создания набора олигонуклеотидных флуоресцентно-меченых зондов, выделения РНК вируса тризольным методом, проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с одновременным флуоресцентным мечением вирусных кДНК, печатью олигонуклеотидного микрочипа, гибридизацией ампликонов с ДНК-микрочипом, содержащим соответствующие дискриминирующие гибридизационные зонды. Использование этого способа позволяет диагностировать болезнь Ньюкасла, грипп птиц, инфекционный бурсит кур (болезнь Гамбора), инфекционный бронхит птиц в клинических образцах одновременно.

Технический результат

Способ экспресс-диагностики вирусных болезней птиц на основе микрочиповой технологии позволяет точно и быстро выявлять РНК вирусов болезни Ньюкасла, гриппа птиц, инфекционного бурсита кур (болезнь Гамбора), инфекционного бронхита птиц. Микрочип имеет преимущество над остальными диагностическими тестами по эффективности, и является более экспрессным и менее затратным тестом с возможностью проводить одновременное обнаружение и идентификацию вышеназванных вирусов в одном эксперименте. При этом возможно одновременное исследование большого количества проб.

Предлагаемый способ экспресс-диагностики вирусных болезней птиц включает следующие этапы:

1. Создание набора олигонуклеотидных зондов для одновременной идентификации генетического материала вирусов болезни Ньюкасла, гриппа птиц, инфекционного бурсита кур (болезнь Гамбора) и инфекционного бронхита птиц в клинических образцах и биологических жидкостях, образцах внешней среды и других вируссодержащих пробах (культуральная вируссодержащая жидкость и т.д).
2. Выделение РНК вирусов тризольным методом;
3. Амплификация и флуоресцентное мечение кДНК вирусов;
4. Печать олигонуклеотидных зондов на микрочипе;
5. Гибридизация флуоресцентно меченых образцов на микрочипе;
6. Сканирование и анализ изображения, получаемого после гибридизации.

1. Создание набора олигонуклеотидных флуоресцентно-меченых зондов

В результате анализа методом множественного выравнивания последовательностей нуклеотидов с использованием программного обеспечения «Mega 6.06» по алгоритму «Clustal W» в качестве мишеней для подбора олигонуклеотидных зондов были выбраны наиболее консервативные области генов исследуемых вирусов.

Для идентификации вируса гриппа А выбраны гены, кодирующие белки «М2» и «NP». Нуклеотидные последовательности этих генов были взяты из базы данных NCBI «Influenza Virus Sequence Database». Для вируса болезни Ньюкасла выбраны последовательности нуклеотидов гена, кодирующий «NP» белок. Для вируса инфекционного бурсита кур выбран сегмент А, «VP2» белка. Для вируса инфекционного бронхита птиц подобраны нуклеотидные последовательности гена, кодирующий «S1» белок.

Олигонуклеотидные зонды составлены с помощью программы OligoWiz 2.1 и Picky 2.20, в которой олигонуклеотиды подбирались в соответствии с такими параметрами, как допустимая длина зонда, положение в гене, температура гибридизации, уровень перекрестной гибридизации. Для каждых кластеров последовательностей выбраны оптимальные последовательности олигонуклеотидов. Подобранные зонды были проанализированы с помощью программы BLAST на предмет их возможной гомологии со всеми известными последовательностями, имеющимися в базе данных GenBank.

Подбор и анализ свойств олигонуклеотидных праймеров проводился с использованием программы Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) в международной базе данных GenBank.

В результате исследований были выбраны 8 олигонуклеотидных зондов для детекции исследуемых инфекций, последовательности которых представлены в таблице 1.

Синтез олигонуклеотидных зондов и праймеров проведены на оборудовании фирмы K&A Laborgeraete, модели DNA/RNA Synthesizer H-16 (производство Германии), согласно инструкции производителя. Зонды получены в ходе стандартного автоматического фосфорамидитного синтеза олигонуклеотидов.

При синтезировании на 5' конце олигонуклеотидных зондов были встроены десятичные последовательности Т и С нуклеотидов, которые хорошо связываются с поверхностью стекла без наличия каких-либо покрытий.

Нуклеотидные последовательности зондов и размеры продуктов амплификации представлены в таблице 1.

Таблица 1

Олигонуклеотидные зонды, использованные в микрочипе для диагностики птичьих инфекций

Наименование зондов	Последовательность нуклеотидов (5` → 3`)	Длина, н.	Наименование возбудителя	Координаты зондов в геноме	Наименование гена
1	2	3	4	5	6
IBDV-VP2	AGGCACAGGCTGCTTCAGGAACTGCTCGAGCCGCGTCAGGAAAAGCAAGRGCTGCCTCAGGCCGCA	66	IBDV	1581-1640	VP2 (сегмент А)
IBV-S1	TTTCTGGTGGTAAATTAGTAGGTATTCTYACTTCACGTAATG	42	IBV	21812-21853	S1
Flu-NP-1	ACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCTTTGACATGA	42	AIV	1403-1444	NP
Flu-NP-2	ATGAGTAATGAAGGDTCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGARGAG	45	AIV	1479-1523	NP
Flu-M2-1	GCAGARTGCTGTGGATGTTGACGATRGTCATTTTGTCAACATAG	44	AIV	928-971	M2
Flu-M2-2	CCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAGTGA	44	AIV	716-759	M2
Flu-M2-3	CCTTCTACGGAAGGAGTRCCWGAGTCTATGAGGGAAGAATATCG	44	AIV	900-943	M2
NDV-NP	AACAGGCCGGGGTCCTCACTGGGCTCAGCGACGAAGGTCCCCGAGCCC	48	NDV	1353-1400	NP

Подобранные олигонуклеотидные последовательности были проанализированы с помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) на предмет их возможной гомологии со всеми известными последовательностями, имеющимися в базе данных GenBank (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) на текущий момент времени. Нуклеотидных последовательностей, высоко гомологичных каким-либо генам других вирусов не обнаружено. Исходя из этого, можно теоретически утверждать, что подобранные олигонуклеотидные зонды к соответствующим генам с высокой степенью специфичности будут взаимодействовать с комплементарными цепями кДНК вирусов. Олигонуклеотидные зонды подобраны с учетом следующих требований: зонды должны быть комплементарны антисмысловой нити генов, что даёт возможность проводить гибридизацию с флуоресцентно мечеными пробами, полученными в процессе обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР); разброс расчётных температур плавления нуклеотидных дуплексов при гибридизации на микрочипе не превышает 2-3°С; в работе использованы праймеры, образующие ПЦР ампликоны, которые содержат последовательности, комплементарные олигонуклеотидным зондам.

2. Выделение РНК вирусов тризольным методом

Выделение РНК вирусов гриппа птиц, болезни Ньюкасла, инфекционного бурсита кур и инфекционного бронхита птиц проводят тризольным методом с использованием реагента «Trizol» («Invitrogen», США), согласно протоколу производителя.

Методика выделения ДНК тризольным методом.

1. К 300 мл пробы и добавляют 750 мкл реагента Тризола, затем инкубируют 10 мин при комнатной температуре;

2. Добавляют 200 мкл хлороформа, суспендируют с закрытой крышкой переворачиванием 15 сек и инкубируют 2-15 мин при комнатной температуре;

3. Центрифугируют на max (12000 g) скорости 15 мин при 4°С. верхнюю фазу (супернатант) отбросить;

4. К нижней фазе добавляют 300 мкл 96% этанола, суспендируют призакрытой крышке, инкубируют 2-3 мин при комнатной температуре;

5. Центрифугируют на 1800 об/мин 5 мин при 4°С. Супернатант и отбрасывают;

6. Осадок промывают в 1 мл цитрата натрия, приготовленного на 10% этаноле и суспендируют;

7. Инкубируют 30 мин при комнатной температуре периодически перемешивая;

8. Центрифугируют на 1800 об мин 5 мин при 4°С. супернатант отбрасывают;

9. Пункты с 7 по 8 повторяются;

10. Добавляют 1.5-2 мл 75 процентного этанола, суспендируют;

11. Инкубируют 10-20 мин при комнатной температуре;

12. Центрифугируют на 1800 об/мин 5 мин при 4. супернатант отбрасывают;

13. Осадок сушится с открытой крышкой при 55°С в течении 5-10 мин;

4°С. К осадку добавляют 50 мкл элюирующего буфера (ЕВ) буфера. Оценка эффективности выявления генетического материала микрочипом проведена на штаммах вирусов:

Штаммы вируса гриппа А:

1) «А/утка/Альберта/35/76» (H1N1);

2) «А/утка/Германия/215» (H2N3);

3) «А/утка/Калифорния/72»(H3N8);

4) «А/утка/Чехословакия/56»(H4N6).

Штаммы вируса инфекционного бурсита кур:

1) «Винтерфильд»;

2) «БГ»;

3) «201»;

4) «Коктал»;

5) «52-70».

Штаммы вируса инфекционного бронхита птиц:

1) «Н-120»;

2) «10-55».

Штаммы вируса болезни Ньюкасла:

1) «Columbalivia /KZ/EKO/15/2014»;

2) «Pelecanus crispus/KZ/Almaty/94/2014»;

3) «52/98»

4) «63/00»

5) «126/01»

6) «247/88»

После выделения РНК измеряли её концентрацию на спектрофотометре Nano Drop 2000 («Nano Drop Technologies», США). По отношению A_{260}/A_{280} судили о чистоте РНК. Концентрация полученной РНК, как правило, находилась в пределах от 50 до 200 нг/мкл, спектрофотометрическое соотношение A_{260}/A_{280} = 1,9-2,0. Такое качество получаемых РНК проб является приемлемым для проведения анализа.

3. Амплификация вирусной РНК

ОТ-ПЦР проводили с помощью набора Super Script III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen) в соответствии с инструкцией производителя (в 50 мкл реакционной смеси: Super Script III RT/Platinum Taq Mix - 1 мкл; 2X Reaction Mix - до lx; праймеры 20 пкм - по 1 мкл; РНК - по 5 мкл; DEPC-treated water до 50 мкл). Для амплификации проб использовали смесь праймеров, подобранных к нуклеотидным последовательностям каждого зонда.

Флуоресцентное мечение пробы осуществляли путем прямого встраивания Cy5-dCTP («Amersham», США) непосредственно в процессе ОТ-ПЦР, реакционная смесь при этом дополнительно содержала 2 мкл 1 мМ Cy5-dCTP.

4. Печать олигонуклеотидного микрочипа

Олигонуклеотидные зонды разведены 1:1 с 2-х кратным буфером для печати олигонуклеотидов («Arrayit corporation», США), в концентрациях ~ 50 пикомоль нанесены на альдегидный субстрат («Arrayit corporation», США) и на стеклянные слайды без подложки («Sigma», США) с использованием спот-принтера NanoPrint LM60 («Arrayit corporation», США).

В схеме микрочипа олигонуклеотидные зонды расположены для каждой диагностируемой инфекции. В первых двух рядах расположены олигонуклеотидные зонды на области генов вируса гриппа А, далее расположены зонды для выявления вирусов инфекционного бурсита кур, инфекционного бронхита птиц и болезни Ньюкасла. Кроме олигонуклеотидных зондов был напечатан буфер для печати (фиг.1). Зонды нанесены на подложку методом контактной печати на принтере Nano Print LM60 («Arrayit corporation», США).

Подобранные олигонуклеотидные зонды использованы для изготовления микрочипа для экспресс-диагностики вирусных болезней птиц. Микрочип состоит из 16-ти идентичных массивов точек, каждый из которых содержит олигонуклеотидные зонды, комплементарные антисмысловой нити генов вирусов гриппа А, болезни Ньюкасла, инфекционного бронхита птиц и инфекционного бурсита кур. Таким образом, схема микрочипа представляет 16 идентичных субэрреев, расположенных в виде массива, состоящего из 2 столбцов и 8 рядов.

Подобранные олигонуклеотидные зонды используются для специфического выявления вирусных болезней птиц: гриппа птиц, болезни Ньюкасла, инфекционного бронхита птиц и инфекционного бурсита кур.

5. Гибридизация на олигонуклеотидном микрочипе

К 20 мкл ПЦР-смеси, содержащий Cy5-кДНК, добавлен буфер для гибридизации в объёме 36 мкл, и доведён до 90 мкл общего объема дистиллированной водой, не содержащий нуклеаз, и прогрет в твердотельном термостате при 99°С в течение 2 мин для денатурации кДНК, затем охлажден во льду в течение 2 мин, и нанесен на микрочип. Параллельно этому олигонуклеотидные зонды на микрочипе денатурированы кипячением стеклянного слайда в дистиллированной воде в течение 1 минуты с последующей инкубацией в 96% этаноле, охлаждённой при -20°С, в течение 1 минуты. После чего слайд высушен центрифугированием при 300 g в течение 2 минут, и вставлен в рамки на 16 субэрреев («Arrayit corporation», США). Гибридизация проведена с использованием термошейкера фирмы «Biosan» (производство Латвии) в течение 2 чв при 37°С с перемешиванием при 250 об/мин. После завершения инкубации проведена отмывка микрочипа от не связавшихся к ДНК проб буферными растворами «А», «В» и «С» фирмы «Arrayit», согласно протоколу производителя. Затем слайд высушен центрифугированием при 300 g в течение 2 мин на центрифуге фирмы «Arrayit» (США), и сканирован на сканере фирмы "Innopsys", модели InnoScan710AL (Франция).

6. Сканирование и анализ изображения, получаемого после гибридизации

Сканирование микрочипов проведено с разрешением 5 мкм, при длинах волн 532 нм и

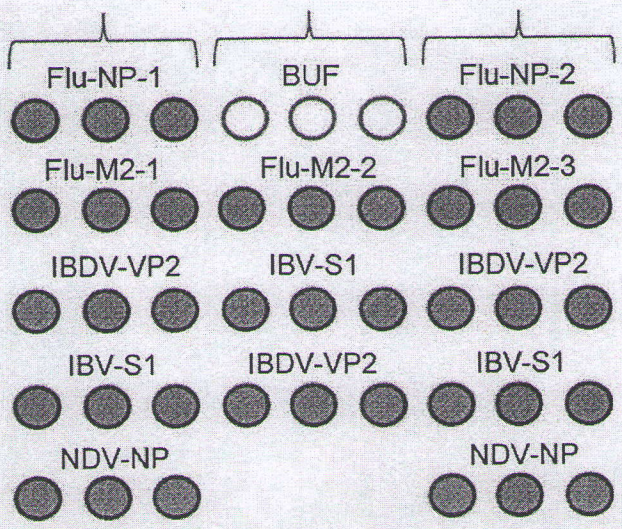
633 нм. Полученные данные обрабатывались с помощью программного обеспечения Mapix ver. 5.5.0 ("Innopsys", Франция).

С использованием данного программного обеспечения на полученное пиксельное изображение накладывали матрицу, соответствующую схеме расположения зондов на микрочипе. Далее по наложенной сетке с помощью программного модуля произведена детекция зондов по интенсивности флуоресцентного свечения с количественными выходными данными. В качестве результативных данных использовали медианные значения флуоресценции зондов за вычетом сигнала фона, выраженные в относительных единицах (ед.). Далее, используя полученные количественные данные, строились диаграммы для каждой анализируемой пробы.

Таким образом, из вышеприведенных этапов работ видно достижение заявляемого технического результата: создан способ экспресс-диагностики вирусных болезней птиц (болезнь Ньюкасла, грипп птиц, инфекционный бурсит кур (болезнь Гамбора), инфекционный бронхит птиц) в вируссодержащих пробах на основе технологии микрочипа.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ экспресс-диагностики вирусных болезней птиц (болезнь Ньюкасла, грипп птиц, инфекционный бурсит кур (болезнь Гамбора), инфекционный бронхит птиц) на основе микрочиповой технологии, ***отличающийся*** тем, что создают набор олигонуклеотидных флуоресцентно-меченых зондов для одновременной идентификации генетического материала вирусов в вируссодержащих пробах, выделяют РНК вируса тризольным методом, амплифицируют с олигонуклеотидами-праймерами при помощи ОТ-ПЦР с одновременным флуоресцентным мечением вирусных к ДНК, печатают олигонуклеотидный микрочип, гибридизируют на олигонуклеотидном микрочипе и проводят сканирование и анализ изображения, получаемого после гибридизации.



Фиг.1 – Расположение олигонуклеотидных зондов на микрочипе для детекции вируса гриппа птиц (Flu-NP-1, Flu-NP-2, Flu-M2-1, Flu-M2-2, Flu-M2-3), инфекционного бурсита кур (IBDV-VP2), инфекционного бронхита птиц (IBV-S1) и болезни Ньюкасла (NDV-NP).

Верстка А. Сарсекеева
Корректор Б. Омарова