



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012108029/15, 05.03.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.03.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.03.2012

(43) Дата публикации заявки: 10.09.2013 Бюл. № 25

(45) Опубликовано: 27.02.2014 Бюл. № 6

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2009181363 A1, 16.07.2009. RIMSTAD E. et al. Identification of a double-stranded RNA virus by using polymerase chain reaction and magnetic separation of the synthesized DNA segments. J Clin Microbiol. 1990 Oct; 28(10): 2275-2278 [Найдено 18.07.2013] [он-лайн], Найдено из Интернет: (см. прод.)

Адрес для переписки:

109428, Москва, Рязанский пр-кт, 24, корп.1,
ВИЭВ

(72) Автор(ы):

Кандрина Наталия Юрьевна (RU),
Ломакина Наталья Федоровна (RU),
Завьялова Елена Александровна (RU),
Гулюкин Михаил Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт экспериментальной ветеринарии
им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ) (RU)**(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛОСОСЕВЫХ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области молекулярной биологии и ветеринарии и предназначено для диагностики вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых. Осуществляют два раунда полимеразной цепной реакции с праймерами В37-В853г и В123-В320г для выявления фрагмента сегмента В, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу вируса инфекционного некроза поджелудочной железы с последующим

электрофоретическим определением размера амплифицируемого фрагмента нуклеотидной последовательности. По наличию на электрофореграмме фрагментов длиной 860 и/или 240 пн в исследуемом образце диагностируют вирус инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых. Предлагаемое изобретение применимо в диагностических исследованиях в научно-исследовательских институтах, ветеринарных лабораториях, рыбководческих хозяйствах. 2 ил., 3 таб., 3 пр.

(56) (продолжение):

<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC268161/pdf/jcm00058-0127.pdf>>. CHRTEST IPNV CARD. One Step IPNV Card lest /Prueba de un solo paso para virus IPNV en cassette. CerTest BIOTEC S.L. 2009 Mar [Найдено 18.07.2013] [он-лайн]. Найдено из Интернет: <URL: <http://www.certest.es/instruccionesvet/IPNV/IUV-IP8%20rev%2000%20folleto.pdf>>. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ по идентификации вирусов и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб.

Министерство сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации (Минсельхозпрод России). Приказ №13-4-2/1054 от 10.10.97 г. [Найдено 18.07.2013] [он-лайн]. Найдено из Интернет: <URL:<http://bmv1.bryansktel.ru/vetzak/document/203.html>>.

R U 2 5 0 8 5 4 7 C 2

R U 2 5 0 8 5 4 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2012108029/15, 05.03.2012**

(24) Effective date for property rights:
05.03.2012

Priority:

(22) Date of filing: **05.03.2012**

(43) Application published: **10.09.2013 Bull. 25**

(45) Date of publication: **27.02.2014 Bull. 6**

Mail address:

**109428, Moskva, Rjazanskij pr-kt, 24, korp.1,
VIEhV**

(72) Inventor(s):

**Kandrina Natalija Jur'evna (RU),
Lomakina Natal'ja Fedorovna (RU),
Zav'jalova Elena Aleksandrovna (RU),
Guljukin Mikhail Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie
Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut
ehksperimental'noj veterinarii im. Ja.R.
Kovalenko (VIEhV) (RU)**

(54) **DIAGNOSTIC TECHNIQUE FOR PACTREATIC INFECTIOUS NECROSIS VIRUS IN SALMON BY
POLYMERASE CHAIN REACTION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: there are performed two rounds of a polymerase chain reaction with the primers B37 - B853r and B123 - B320r to detect a fragment of a segment B coding a RNA-dependent RNA-polymerase of a pancreatic infectious necrosis virus that is followed by an electrophoretic measurement of a size of an amplified fragment of a nucleotide

sequence. If the electrophoregram shows the fragments of the length of 860 and/or 240 pn in the analysed sample, the pancreatic infectious necrosis virus is diagnosed in salmon.

EFFECT: invention is applicable for the diagnostic purposes in scientific research institutions, veterinary laboratories, and fish farms.

2 dwg, 3 tbl, 3 ex

RU 2 5 0 8 5 4 7 C 2

RU 2 5 0 8 5 4 7 C 2

Предлагаемое изобретение относится к области биотехнологии, молекулярно-генетической диагностики вирусных болезней животных, научных исследований в ветеринарии и молекулярной биологии.

Инфекционный некроз поджелудочной железы (Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) - высококонтагиозная вирусная болезнь, поражающая молодь культивируемых лососевых и некоторых видов рыб других семейств, обитающих как в пресной, так и в морской воде. Вирус инфекционного некроза поджелудочной железы наносит существенный экономический ущерб рыбоводческим хозяйствам РФ.

В комплексе мероприятий по оздоровлению хозяйств от вируса инфекционного некроза поджелудочной железы ведущее место принадлежит диагностике. Отсутствие коммерчески доступных диагностикумов на отечественном рынке вызвало необходимость создания тест - системы для идентификации IPNV методом полимеразной цепной реакции.

В настоящее время совершенствование методов диагностики IPNV крайне необходимо поскольку традиционные методы выделения вируса в культурах клеток не всегда позволяют идентифицировать вирус и занимают длительное время.

Принцип ПЦР заключается в многократном увеличении (амплификации) определенного участка ДНК выявляемого объекта путем его копирования с помощью фермента ДНК-полимеразы и специфических праймеров. Поскольку геном IPNV представлен двухцепочечной молекулой РНК в виде двух сегментов А и В, предварительно - перед постановкой ПЦР-РНК переводят в кДНК благодаря ферменту обратной транскриптазе. Специфические праймеры (прямой и обратный) ограничивают определенный фрагмент нуклеотидной последовательности таким образом, что элонгация новой цепи кДНК при обратной транскрипции и последующей амплификации в ПЦР происходит только между ними. Основными параметрами эффективного прохождения реакции амплификации, обеспечивающими специфичность и чувствительность, являются правильный выбор области генома идентифицируемого агента, структура и температурный режим отжига олигонуклеотидных праймеров.

Известны способы выявления фрагмента генома вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых методом ПЦР с использованием праймеров к сегменту А [1].

Также описан способ выявления РНК вируса инфекционного некроза поджелудочной железы методом «гнездовой» ПЦР (nested-PCR) с праймерами к сегменту А, которые имеют следующую структуру:

1 5'-ССААССААСAGGTCCTATCCTAC-3' (внешний прямой)

2 5'-TGATGCCGTTGTTCTCATCAGCTG-3' (внешний обратный)

3 5'-GAAGGAGATGACATGTGCTACACC-3' (внутренний прямой праймер с биотинилированной меткой на 5'-конце)

4 5'-GAGAGATGTGTTTGCCACCATCTC-3' (внутренний обратный)

Фрагмент, полученный в первом раунде ПЦР, служит матрицей во втором раунде ПЦР. Во втором раунде используется два меченых праймера: один имеет биотинилированную метку на 5'-конце, другой содержит радиоактивную метку ³²P. Разделение ампликонов проходит с использованием магнитных частиц с последующей детекцией уровня радиоактивного излучения [2].

Известные способы выявления фрагментов генома вируса инфекционного некроза поджелудочной железы не лишены недостатков: использование радиоактивной метки требует соблюдения специальных мер безопасности и лицензирования лаборатории, в способе, предложенном К. Williams et al., амплифицируется фрагмент гена VP2,

характерный для всех бирнавирюсов, что не исключает возможность ложноположительных результатов. Описанные в литературе праймеры подобраны к генам сегмента А. В то же время установлено, что изоляты IPNV, выделенные из разных географических мест, отличаются высоким генетическим разнообразием, главным образом, обусловленным вариабельностью генов, кодируемых именно сегментом А. В этой связи высока вероятность того, что праймеры к сегменту А могут не подойти к вновь изолированным вирусам с измененным генотипом. В первую очередь это касается изолятов из водоемов тех регионов, где исследование на присутствие IPNV ранее не проводилось.

Для идентификации возбудителя методом ПЦР целесообразно использовать праймеры к наиболее консервативной области генома. В случае IPNV это может быть сегмент В, кодирующий ключевой фермент репликации вирусного генома РНК-зависимую РНК-полимеразу.

В задачу исследований входило - разработка эффективного способа обнаружения фрагментов генома вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых методом гнездовой ПЦР с использованием 4 специфических олигонуклеотидных праймеров.

Первоочередной задачей было конструирование четырех специфических праймеров к IPNV, которые являются главным компонентом ПЦР и обеспечивают ее специфичность и чувствительность.

Для выбора праймеров был использован сегмент В - в то время как в публикациях преимущественно описаны праймеры к сегменту А. При конструировании праймеров и оценке их специфичности использовали нуклеотидные последовательности и программу BLAST, доступные в Интернете на сайте NCBI. Предложенный способ заключается в следующем: с помощью компьютерной программы DNASTAR (Lasergene Co., США) на основании программы, предоставленной в базах данных Интернет ресурсов GenBank (CLUA), по генотипам вируса инфекционного некроза поджелудочной железы выбирают референс - последовательность NC_001916 штамма Jaspreg. Праймеры проверяют на отсутствие гомологии с последовательностями других вирусов и генома человека программой BLAST с помощью веб-ресурса Национального центра биотехнологической информации (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). На основании проведенного компьютерного анализа была подобрано 2 пары праймеров: внешние В37 и В853г и внутренние В123 и В320г.

Название	5'–3'	длина
В37	ACG TTG GTG GCA CCC GAC ATA C	22
В123	TGT CGG ACA TCT TCA ACT CAC C	22
В320г	CAG TCG AGGCAG AGCGGC ATC	21
В853г	GTG TCT CCT TTGGTT TTGCCT ATG	24

Синтез разработанных олигонуклеотидных праймеров заказывается в коммерческом сервисном центре.

Четыре праймера к сегменту В были подобраны таким образом, что позволяют применить технику гнездовой и полугнездовой ПЦР, а также могут быть использованы для секвенирования.

Праймеры имеют следующую характеристику: комплементарность выбранной области гена сегмента В, отсутствие самокомлементарных участков внутри каждого праймера и между прямым и обратным, фланкируют область фрагментов гена В размером 860 пн и ≈240 пн, соответственно. Синтез разработанных олигонуклеотидных праймеров заказывается в коммерческом сервисном центре.

Пример 1

Амплификация специфических фрагментов кДНК вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых с помощью разработанных праймеров для диагностики болезни.

В процессе проведения практических экспериментов подбирают оптимальные условия прохождения полимеразной цепной реакции с разработанными праймерами.

Предварительно проводят реакцию обратной транскрипции с парой внешних праймеров. Реакция обратной транскрипции проходит при 42° в течение 45 минут, затем полученную кДНК прогревают при 95° в течение 3 минут и используют для постановки ПЦР. Состав реакционной смеси указан в таблице 1. В качестве положительного контроля на стадии обратной транскрипции и ПЦР используют эталонные штаммы IPN (предоставлен доктором E. Neuvonen, Ветеринарный институт, Хельсинки, Финляндия. Предварительно штамм был испытан методом ИФА), в качестве отрицательного - воду или среду для культур клеток (например, Игла MEM).

Полимеразную цепную реакцию проводят в объеме реакционной смеси 25 мкл на 1 пробу ДНК.

Состав реакционной смеси представлен в таблице 2. Температурно-временной режим проведения реакции для амплификатора «Терцик» («ДНК-технология», Россия) представлен в таблице 3. Условия амплификации и реакционной смеси для первого и второго раунда одинаковые.

После проведения реакции амплификации продукты ПЦР анализируют методом электрофоретического разделения в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

В процессе ПЦР были получены продукты амплификации кДНК вируса инфекционного некроза поджелудочной железы размером около 860 пн в первом раунде ПЦР и 240 пн во втором раунде ПЦР, что подтверждалось во всех экспериментах. Электрофореграмма результатов ПЦР представлена на рис.1. При учете результатов ПЦР в первую очередь оценивали контрольные образцы. В электрофоретической дорожке с положительным контрольным образцом (К+) присутствовала светящаяся полоса на уровне соответствующем фрагменту длиной 860 или 240 пн (в первом и втором раунде, соответственно; оценивали по маркеру М).

Опытные пробы оценивали по наличию в соответствующей дорожке специфической полосы, которая в положительных образцах располагалась на том же уровне, что и полоса в положительной контрольной пробе. В отрицательных пробах полоса отсутствовала (рис.2).

Пример 2

Определение чувствительности реакции амплификации с использованием разработанных специфических олигонуклеотидных праймеров.

Анализировали десятикратные разведения инфицированной IPNV суспензии клеток с исходным титром 7,5 lg ТЦД₅₀/мл. (10^{7,5} ТЦД₅₀/мл).

При проведении «гнездовой» ПЦР последним разведением, в котором обнаруживалась специфическая полоса, было разведение 10⁻⁷, что соответствует 0,5 lg ТЦД₅₀/мл или ~3 ТЦД₅₀/мл. Электрофореграмма результатов ПЦР представлена на Рисунке 2.

Пример 3

Определение специфичности реакции амплификации с использованием разработанных специфических олигонуклеотидных праймеров.

Специфичность праймеров проверяли на образцах вируса инфекционного некроза

гемопозитической ткани, вируса инфекционного некроза поджелудочной железы и вируса геморрагической септицемии лососевых. Специфическая полоса была выявлена только в случае наличия в пробе вируса инфекционного некроза поджелудочной железы.

Предложенный вариант апробирован с положительным результатом и регулярной воспроизводимостью в 2010-2011 годах на 500 пробах, полученных из гомогената внутренних органов рыб, поступивших из хозяйств Московской, Рязанской областей и республики Карелия, а также инфицированных клеточных культур.

Предлагаемое изобретение найдет применение в диагностических исследованиях в научно-исследовательских институтах, ветеринарных лабораториях, рыбоводческих хозяйствах.

Литература

1. Williams K., Blake S., Sweeney A., Singer J.T., Nicholson B.L. // Multiplex Reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses // J of clinical microbiology. - 1999. - V.37 (№12). - P.4139-4141.

2. Rimstad E., Homes E., Olsvik O., Hyllseth B. // Identification of a double-stranded RNA virus by using polymerase chain reaction and magnetic separation of the synthesized DNA segments // J of clinical microbiology - 1990 -. V.28 (№10). - P.2275-2278.

Сущность изобретения поясняется таблицами и рисунками, в которых отображается следующая информация:

Таблица 1

Состав реакционной смеси обратной транскрипции для 1 реакции объемом 20 мкл

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Объем на 1 реакцию, мкл
Буфер для MMLV («Promega»)	5x	1x	4
дНТФ	10 мМ	0,5 мМ	1
«Прямой» праймер В37	10 мМ	0,5 мМ	1
«Обратный» праймер В853	10 мМ	0,5 мМ	1
Вода			8
Обратная транскриптаза MMLV («Promega»)	200 ед/мкл	20 ед/реакцию	0,1
РНК (матрица)			5

Таблица 2

Состав реакционной смеси для проведения ПЦР для 1 реакции объемом 25 мкл

Компоненты ПЦР	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Объем на 1 реакцию
ПЦР-смесь 2 red	2,5 x	1x	10 мкл
дНТФ	10 мМ	0,2 мМ	0,5 мкл
«Прямой» праймер В37(В123)*	10 мМ	0,2 мМ	0,5 мкл
«Обратный» праймер В853 (В320)*	10 мМ	0,2 мМ	0,5 мкл
Вода			8,5 мкл
кДНК (матрица)			5 мкл

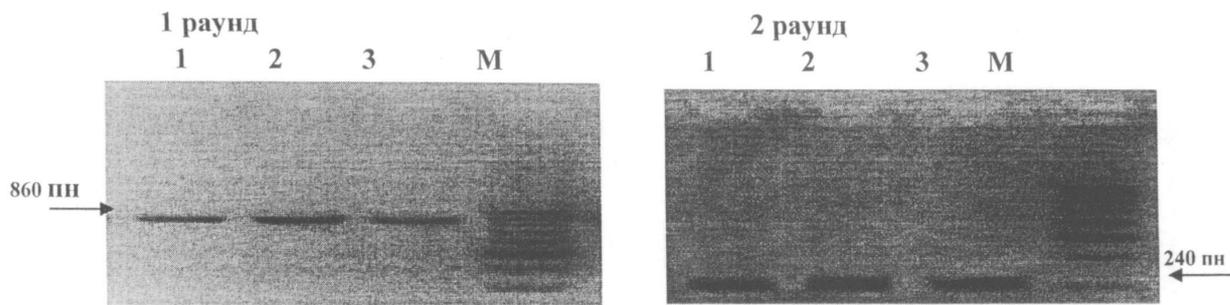
* в скобках указаны праймеры для второго раунда ПЦР

Таблица 3

Температурно-временной режим проведения ПЦР (прибор «Терцик», Россия)				
Описание стадии		Температура, °С	Длительность, сек.	Кол-во циклов
1	Предварительное нагревание прибора «пауза»	94	-	-
2	Черничная денатурация ДНК	95	120	1
3	Денатурация ДНК	95	20	3
4	Гибридизация праймеров со специфическими участками	50	20	
5	Синтез комплементарных цепей	72	50	
6	Денатурация ДНК	95	20	30
7	Гибридизация праймеров со специфическими участками	58	20	
8	Синтез комплементарных цепей	72	50	
9	Конечный синтез комп-х цепей	72	120	1
10	Хранение	10	-	-

Формула изобретения

Способ диагностики вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых методом полимеразной цепной реакции, при котором используют два прямых и два обратных олигонуклеотидных праймера для выявления фрагмента сегмента В, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу вируса инфекционного некроза поджелудочной железы следующей структуры - В37: АСГТТGGTGGCАСССGACATAC, В123: TGTCGGACATCTTCAACTCACC, В320r: CAGTCGAGGCAGAGCGGCATC, В853r: GTGTCTCSTTTGGTTTTGCSTATG, с электрофоретическим определением размера амплифицируемого фрагмента нуклеотидной последовательности, где по наличию на электрофореграмме фрагментов длиной 860 и/или 240 пн в исследуемом образце диагностируют вирус инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых.



Электрофорез в 2,5% агарозном геле фрагментов генома IPNV, амплифицированных в ПЦР с праймерами В37 - В853 r (1 раунд) и В123 - В320r (2 раунд). Дорожки: 1-2- полевые пробы, 3-положительный контроль, М-маркер длин от 200 до 1000 пн.

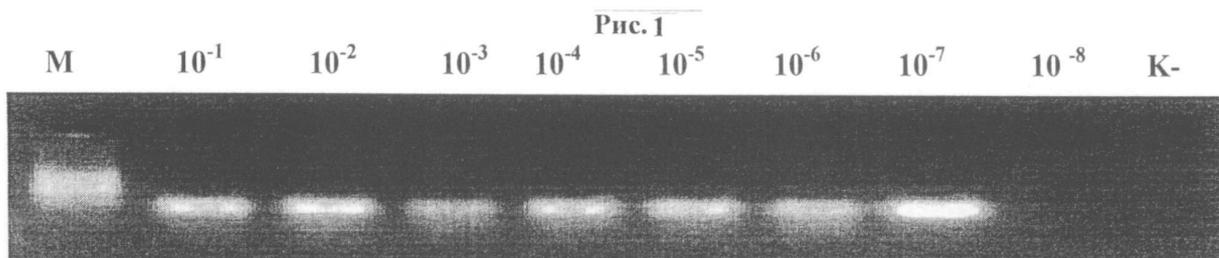


Рис. 1
 Определение чувствительности двухраундовой ПЦР с праймерами к IPNV. Продукт 2 раунда ПЦР с праймерами В123 – В320 r (фрагмент ~ 240 пн)
 Дорожки: 1- Маркер длин. 10-отрицательный контроль 2-9- десятикратные разведения суспензии клеток, инфицированных вирусом инфекционного некроза поджелудочной железы. Исходный титр $10^{7,5}$ ТЦД₅₀/мл.

Рис.2