

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее», посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - 2017. - Т.1, Ч.6. - С.147-148

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ (LAMP)

Кирибаева А.К., Хасенов Б.Б., к.х.н

Национальный центр биотехнологии, г. Астана

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) является инфицирующим агентом классифицируемым по ряду признаков в род *Deltaretrovirus* семейства *Retroviridae*. ВЛКРС является родственным вирусу Т-клеток типа 1 и 2 [1, 2]. Вирус инфицирует В-клетки и вызывает злокачественный лейкоз крупного рогатого скота [3]. Неконтролируемое развитие вируса ведет к распространению инфекции среди скота, что наносит большой экономический ущерб животноводству. В связи с чем, актуальна задача быстрого выявления скрытой инфекции. Одним из способов выявления случаев инфицирования является использование метода молекулярной диагностики основанной на амплификации вирусных фрагментов ДНК с геномной ДНК инфицированных животных. Классическим способом является использование метода полимеразной цепной реакции. Альтернативным способом является применения метода петлевой изотермической амплификации (Loop Isothermal Method Amplification) [4, 5]. Преимущество данного метода заключается в отсутствии необходимости применения дорогостоящего оборудования в виде термоциклеров-амплификаторов и в скорости постановки самой реакции 30 минут, что актуально при проверке большого числа образцов.

Цель работы заключается в разработке способа идентификации вируса лейкоза крупного рогатого скота методом петлевой изотермической амплификации.

Объектами исследований являлись образцы геномной ДНК крупного рогатого скота с подтвержденным диагнозом лейкоз КРС.

Использовались методы полимеразной цепной реакции, электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов в агарозном геле, клонирование гена в высококопийную плазмиду pGEM_T, трансформация компетентных клеток *Escherichia coli*, секвенирование по методу Сенгера. Для анализа и обработки данных использовали программное обеспечение Clone Manager и Vector NTI.

В качестве генетического локуса был выбран LC164086 (8720 п.о.) из базы данных GenBank, соответствующий полной последовательности ВЛКРС. Для амплификации целевой мишени на 580 п.о. были подобраны

праймеры фланкирующие всю мишень: BLVfw (5'-TGTATGAAAGATCATGCCGAC-3') и BLVrv (5'-AGAGAATTGTTAGGGTTCCGG-3'). С использованием стандартных методов генетической инженерии целевой locus был амплифицирован из геномной ДНК КРС с подтвержденным диагнозом лейкоз КРС и клонирован в плазмидном векторе pGEM-T. Клонирование целевого генетического локуса осуществляли путем прямого клонирования очищенного ПЦР-продукта в линеализированный pGEM-T вектор по процедуре T/A клонирования. Лигазной смесью обрабатывали компетентные клетки штамма DH5 α методом температурного шока. Отбор клонов трансформантов проводили на агаризованной питательной среде Лурия-Бертани с добавлением антибиотика ампициллина, активатора lac оперона изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид и хромогенного субстрата x-gal. На основании результатов бело-синей селекции было отобрано 15 клонов-трансформантов. ПЦР-скрининг колоний, проводили с использованием M13fw (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') и M13rv (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') праймеров, фланкирующих регион вставки в векторе pGEM-T/BLV. Расчетный размер амплифицированного фрагмента положительных клонов составляет 812 п.о. Установлено, что положительный результат ПЦР-скрининга наблюдается у восьми клонов.

Положительные клоны №8 и №9 были наработаны в среде Лурия-Бертани для наработки плазмидной ДНК. Секвенирование плазмидной ДНК клонов проводили по методу Сенгера с использованием праймеров M13fw/rv. В результате была получена нуклеотидная последовательность клонированного генетического локуса ВЛКРС:

TGTATGAAAGATCATGCCGACCTAGGCGCCGCCACCGCCCCGТАА
 ACCAGACAGAGACGTCAGCTGCCAGAAAAGCTGGTGACGGCAGCTGGT
 GACTAGAATCCCCGTACCTCCCCAACTTCCCCTTTCCCGAAAAATCCAC
 ACCCTGAGCTGCTGACCTCACCTGCTGATAAACTAATAAAATGCCGGCC
 CTGTCGAGTTAGCGGGCGCCAGAAGCGTTCTTCTCCTGAGACCCTCGTGC
 TCAGCTCTCGGTCCCTGAGCTCTCTTGCTCCCGAGACCTTCTGGTCCGGCT
 ATCCGGCAGCGGTCAGGTAAGGCAAACCACGGTTTGGAGGGTGGTTCT
 CGGCTGAGACCACCGCGAGCTCTATCTCCGGTCCCTCTGACCGTCTCCAC
 GTGGACTCTCTCCTTTGCCTCCTGACCCCGCGCTCCAAGGGCGTCTGGC
 TTGCACCCGCGTTTGTCTCTTGTCTTACTTTCTGTTTCTCGCGGCCCGCG
 CTCTCTCCTTCGGCGACCTCTAGCGGCCAGGAGAGACCGGCAAACAAT
 TGGGGGCTCGTCCGGGATTGATCACCCCGGAACCCTAACAATTCTCT.

На основе полученных данных были подобраны и синтезированы олигонуклеотиды, специфичные к целевому locus и используемые в LAMP-реакции:

F3-BLV (5'-AGACGTCAGCTGCCAGAA-3');

B3-BLV (5'-GGATAGCCGACCAGAAGGT-3');

FIP-BLV

GGTACGGGGATTCTAGCCAGCTGGTGACGGCAGCTGGT-3');

(5'-

VIP-BLV (5'-TCGGGAGCAAGAGAGCTCAGCGTGCTCAGCTCTCGGTC-3').

С использованием данных олигонуклеотидов была проведена реакция петлевой изотермической амплификации по методу LAMP. Реакционная смесь состояла из: олигонуклеотидов F3-BLV, B3-BLV, FIP-BLV, VIP-BLV, матричной ДНК р-GEM-T/BLV, Bst ДНК полимеразы, реакционного буфера Bst-Buffer 1X, бетаина, MgSO₄. Реакцию амплификации проводили при температуре +65°C, в течение 60 минут. Инактивацию Bst ДНК полимеразы проводили путем прогрева при температуре +80°C в течение 15 минут. Визуализацию результатов проводили в 3% агарозном геле.

Как показали результаты LAMP реакции олигонуклеотиды с указанной последовательностью позволяют образовывать петли в изотермических условиях, что свидетельствует о перспективности использования генетического локуса ВЛКРС в качестве целевой мишени для разработки диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота.

Список литературы

1. Kettman R., Burny A., Callebaut L., Droogmans L., Mammerickx M., Willems L., Portetelle D. Bovine leukemia virus // *The Retroviridae*. – 1994. – Vol.3. – P. 39-81.
2. Sagata N., Yasunaga T., Tzuzuku-Kawamura J., Ohishi K., Ogawa Y., Ikawa Y. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1985. – Vol.82, №3. – P. 677-681.
3. Tajima S., Ikawa Y., Aida Y., Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development // *J.Virol.* – 1998. – Vol.72, №9. – P. 7569-7576.
4. Pelzer K.D., Economics of bovine leukemia virus infection// *Vet.Clin.North. Am.Food.Anim.Pract.* – 1997. – Vol.13, №1. – P. 129-141.
5. Parida M., Sannarangaiah S., Dash P.K., Rao P.V., Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in medical virology*. – 2008. – Vol.18, №6. – P. 407-421.