



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

[C12Q 1/66 \(2006.01\)](#)**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

Статус: действует (последнее изменение статуса: 19.02.2018)

(21)(22) Заявка: [2016109396](#), 15.03.2016(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.03.2016

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.03.2016

(43) Дата публикации заявки: 20.09.2017 Бюл.
№ [26](#)(45) Опубликовано: [08.02.2018](#) Бюл. № [4](#)(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2012144762 А, 27.04.2014. RU
2445370 С1, 20.03.2012. ГУЛЮКИН М.И. и
др. Применение полимеразной цепной
реакции (ПЦР) для выявления вируса
лейкоза КРС. - Харьков: Ветеринарная
медицина, вып.92, с.145-150.

Адрес для переписки:

420029, г. Казань, ул. Заря, 30, кв. 68,
Усольцев Константин Валерьевич

(72) Автор(ы):

Никитин Андрей Иванович (RU),
Усольцев Константин Валерьевич (RU),
Фаизов Тагир Хадиевич (RU),
Чернов Альберт Николаевич (RU),
Усольцева Ирина Игоревна (RU),
Семенова Мария Евгеньевна (RU),
Хаммадов Наиль Ильдарович (RU),
Алеева Замиля Загитовна (RU),
Хусниев Фарит Абдуллович (RU),
Ахмадеев Рафаил Мазитович (RU),
Валидов Шамиль Завдатович (RU),
Шуралев Эдуард Аркадьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Федеральный
Центр токсикологической, радиационной
и биологической безопасности" ФГБНУ
"ФЦТРБ-ВНИВИ" (RU)

(54) СПОСОБ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. Описан способ экспресс-диагностики лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Способ включает использование прямого и обратного олигонуклеотидного праймера, с добавлением в реакционную смесь олигонуклеотидного зонда с флуоресцентной меткой для выявления фрагмента гена провируса лейкоза крупного

рогатого скота, отличающийся тем, что используют в качестве праймеров олигонуклеотиды структуры

P_F: 5'-GGCACCGGGTTCGCAAGTATG-3'

, **P_R: 5'-CGGTTAGGCTGGTCATGTGGCC-3'**, а в качестве олигонуклеотидного зонда - зонд RT **P 24 AAACACTACGACTTGCAATCTTACAGGCCGAC**, меченный с 5'-конца флуоресцентным красителем ROX и с 3'-конца гасителем RTQ2. Изобретение расширяет арсенал способов диагностики лейкоза крупного рогатого скота. 6 ил., 8 табл.

Изобретение относится к области химии. Описан способ экспресс-диагностики лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Способ включает в себя использование прямого и обратного праймера, с добавлением в реакционную смесь олигонуклеотидного зонда с флуоресцентной меткой для выявления гена провируса лейкоза крупного рогатого скота. Выбор области генома идентифицируемого агента, структура и температурный режим отжига олигонуклеотидных праймеров.

Известен способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), включающей прямой и обратный олигонуклеотидные праймеры для выявления фрагмента гена *pol* провируса лейкоза крупного рогатого скота с электрофоретическим определением размера амплифицируемого фрагмента нуклеотидной последовательности, в качестве праймеров используют олигонуклеотиды следующей структуры - **P_{F2}: 5'-TGAACGGACAAATGGACTGCTC-3'**;

P_{R2}: 5'-CCGACAGAGAGCGAGGAGAG-3'. При постановке ПЦР этим способом размер продукта на выходе составляет 438 пар нуклеотидов.

Однако, данный способ требует проведение дополнительной стадии электрофоретической детекции, что повышает вероятность возникновения контаминации (пат. RU №2445370, МПК C12Q 1/68, опубл. 20.03.12 г.).

Известен также способ выделения ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота методом ПЦР в режиме реального времени, включающий прямой и обратный олигонуклеотидные праймеры с добавлением в реакционную смесь олигонуклеотидного зонда с флуоресцентной меткой для выявления фрагмента гена провируса лейкоза крупного рогатого скота с определением размера амплифицируемого фрагмента нуклеотидной последовательности. В качестве праймеров используют - Pol (nested, sense) **5'-CTACCTTGCAGATCTCATC-3'** и Pol (nested, antisense) **5'-GCTTGTCGAAGCTCTGCAATGC-3'** и добавляют в реакционную смесь синтезированный зонд - Pol (molecular beacon) **5'(FAM)—CGAGCACACCCACTACCCGCCGCGCTCG-dabcyl-3'** с флуоресцентной меткой. Размер продукта на выходе составляет 202 п.н. (Гулюкин М.И. и др. Применение ПЦР для выявления вируса лейкоза крупного рогатого скота. Харьков, «Ветеринарная медицина», вып. 92. с. 145-150).

В этом способе выявления ДНК провируса крупного рогатого скота методом ПЦР, наиболее близком к предлагаемому, из-за низкой консервативности и малой варибельности снижается специфичность и эффективность обнаружения ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel antiretroviral therapies in human. N. Gillet, A. Florins, M. Boxus, C. Burtreau, A. Nigro, F. Vandermeers, H. Balon, Amel-BayaBouzar, J. Defoichel, A. Burny, M. Reichert, R. Kettmann and Luc Willems. *Retrovirology* 2007, 4:18).

Технический результат, на достижение которого направлено изобретение, заключается в создании более специфичного и чувствительного способа обнаружения ДНК провируса

лейкоза крупного рогатого скота методом ПЦР путем использования другой нуклеотидной последовательности генома вируса лейкоза крупного рогатого скота, а именно области гена p24.

Для достижения этого технического результата в способе экспресс-диагностики лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, включающий использование прямого и обратного олигонуклеотидного праймера, с добавлением в реакционную смесь олигонуклеотидного зонда с флуоресцентной меткой для выявления фрагмента гена провируса лейкоза крупного рогатого скота, выявляют фрагмент гена p24 провируса лейкоза крупного рогатого скота и используют в качестве праймеров олигонуклеотиды структуры:

P_F: 5'-GGCACCGGGTTCGCAAGTATG-3';

P_R: 5'-CGGTTAGGCTGGTCATGTGGCC-3',

а в качестве олигонуклеотидного зонда-зонд

RT p24:AAACACTACGACTTGCAATCTTACAGGCCGAC, меченный с 5'-конца флуоресцентным красителем ROX и с 3'-конца гасителем RTQ2, которые имеют следующие характеристики: отсутствие самокомплементарных участков внутри каждого праймера и между прямым и обратным, температура отжига составляет 61,0°C для P_F, 62,2°C для P_R 66,4°C для RT и фланкируют область консервативного гена p24 ВЛКРС размером 140 пар нуклеотидов консервативного гена p24 провируса лейкоза КРС, который обнаруживают за счет детекции сигнала флуоресценции.

В результате ПЦР на стадии отжига происходит комплементарное присоединение праймеров и зонда к молекуле ДНК-мишени. Во время стадии элонгации происходит разрушение зонда за счет 3'-нуклеазной активности полимеразы, а флуоресцентная метка (краситель) выходит в реакционную смесь. Детектирующий амплификатор фиксирует свободную флуоресценцию реакционной смеси и по уровню флуоресценции можно контролировать прохождение ПЦР в режиме реального времени.

Отличительными признаками предлагаемого способа экспресс диагностики лейкоза крупного рогатого скота от прототипа, являются использование другой нуклеотидной последовательности генома ВЛКРС, а именно области гена p24, которая отличается более высокой степенью консервативности и использование олигонуклеотидного зонда меченого 5'-конца флуоресцентным красителем ROX и 3'-конца гасителем RTQ2, что позволяет получить достоверный, высокочувствительный, высокоспецифичный способ выявления фрагмента провирусной ДНК ВЛКРС в биологическом материале в течение 4 часов.

Предложенный способ осуществляли с помощью компьютерной программы Vector NTI 9.0 (Introgen, США). На основании информации, представленной в базах данных Интернет ресурсов EMBL (Германия), GenBank(США), по генотипам ВЛКРС была выбрана референс последовательность - K02120. Для оценки варибельности и поиска консервативных участков нуклеотидных последовательностей, ограничивающих эту область, был произведен с использованием компьютерной программы BioEdit. В результате анализа была выбрана консервативная нуклеотидная последовательность гена p24. Подборка оптимальных к последовательности гена p24 праймеров и зонда. Проверка качеств, термодинамический анализ выбранных олигонуклеотидов был выполнен с помощью программы Vector NTI 9.0 (Introgen, США). Праймеры были проверены на отсутствие гомологии с последовательностями других вирусов и генома человека программой BLAST с помощью web-ресурса Национального центра биологической информации (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Оценка специфичности подтвердила гомологичность выбранных праймеров и зонда с нуклеотидной последовательностью гена p24 и отсутствие значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями других видов вирусов. Расчетная длина специфического фрагмента составила 140 пар

нуклеотидов (п.н.) Схема фланкируемого участка гена p24 генома вируса лейкоза крупного рогатого скота праймерами P_F p24_140 и P_R p24_140 представлена на рис. 1.

В таблице 1 приведены нуклеотидные последовательности праймеров и зонда, предлагаемые для обнаружения возбудителя лейкоза крупного рогатого скота по гену p24, кодирующего нуклеотидный белок.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и зонда

Возбудитель	Название	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	ген
Вирус лейкоза КРС	P _F p24	GGCACCGGGTTCGCAAGTATG	p24
	P _R p24	CCGTTAGGCTGGTCAATGTGGGC	p24
	probe_RT p24	ROX-AAACACTACGACTTGCAATCTTACAGGCCGAC-RTQ2	p24

Представленные праймеры и зонд имеют следующие характеристики: комплементарность к области гена p24 ВЛКРС, отсутствие самокомплементарных участков внутри каждого олигонуклеотида и между собой. Температура отжига составляет 61,0°C для P_F p24, 62,2°C для P_R p24 и 66,4°C для probe_RTp24. GC состав: 61,9% для P_Fp24, 63,6% - P_R p24, 46,9% для probe_RTp24. Праймеры фланкируют фрагмент консервативного гена p24 ВЛКРС размером 140 пар нуклеотидов. Синтез разработанных олигонуклеотидных праймеров заказывается в коммерческом сервисном центре. Характеристика разработанных праймеров приведена в таблице 2.

Таблица 2. Характеристика разработанных праймеров и нуклеотидного зонда

Название	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Тотж. °C / GC состав, %	Локализация в геноме BLV	Длина продукта, п.н.
P _F p 24	GGCACCGGGTTCGCAAGTATG	61,0/61,9	831-851	140
P _R p 24	CCGTTAGGCTGGTCAATGTGGGC	62,2/63,6	949-970	
probe_RTp 24	ROX-AAACACTACGACTTGCAATCTTACAGGCCGAC - RTQ2	66,4/46,9	857-888	

В процессе проведения практических экспериментов подбирают оптимальные условия прохождения полимеразной цепной реакции, с использованием разработанных праймеров. Состав реакционной смеси представлен в таблице 3.

Таблица 3. Состав реакционной смеси

Компоненты	Объем на 1 реакцию (25 мкл), мкл
Буфер ПЦР	2,5
дНТФ(10 мМ)	2,5
MgCl ₂ (25 мМ)	2,5
P _F p 24	1
P _R p 24	1
probe_RTp 24	1
Полимераза Taq(5 ед./мкл)	0,5
Вода (бидистиллированная)	9
Проба ДНК	5

Как видно из таблицы 3, полимеразную цепную реакцию проводят в объеме реакционной смеси 25 мкл на 1 пробу ДНК.

Температурно-временной режим проведения реакции для амплификатора «Терцик» («ДНК-технология», Россия) представлен в таблице 4.

Таблица 4. Температурно-временной режим проведения ПЦР

Этапы	Температура, °С	Время	Количество, циклов
1	95	5 минуты	1
2	94	15 секунд	42
	61	30 секунд (детекция флуоресценции)	
4	10	хранение	1

В качестве положительного контроля прохождения полимеразной цепной реакции с применением разработанных праймеров, используют лиофилизированный препарат положительного контрольного антигена (АГ) ВЛКРС. Препарат получен из вируса, накопленного в вируспродуцирующей культуре клеток почки эмбриона овцы (FLK). Предварительно препарат АГ был испытан в ПЦР анализе с помощью коммерческих наборов для детекции ДНК провируса лейкоза КРС отечественных производителей.

Детекцию результатов проводили в процессе амплификации на стадии «отжига» праймеров посредством детектирующего амплификатора ДТ-96 производства «ДНК-технология». Учет результатов вели по каналу флуоресценции ROX. Результаты анализа показаны в таблице 5 и на рис. 2, показана зависимость флуоресценции канала ROX от номера цикла по накоплению провируса лейкоза, где С 7 - положительный контроль (лиофилизированный препарат положительного контрольного антигена ВЛКРС), С 3 - отрицательный контроль.

Таблица 5. Результаты по накоплению провируса ВЛКРС в ПЦР

Номер лунки в измерительном блоке амплификатора	Идентификатор пробирки	Ср. Rox	Результат
С3	К-		-
С7	К+ (FLK)	23,9	+

Примечание: C_p - количество циклов ПЦР, необходимых для пересечения графика флуоресценции с пороговой линией C_t (Threshold)

Из таблицы 5 видно, положительное значение C_p по каналу ROX равное 23,9 свидетельствует о накоплении в процессе ПЦР ожидаемого продукта реакции - участка провирусной ДНК ВЛКРС.

Также учет результатов ПЦР был выполнен с помощью горизонтального электрофореза в 1,8% агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

В процессе ПЦР получены продукты амплификации ДНК провируса лейкоза КРС длиной 140 п.н. Это свидетельствует о воспроизводимости результатов проведенных опытов. Электрофореграмма результатов полимеразной цепной реакции представлена на рис. 3, где 1 трэк - маркер молекулярного веса (от 100 до 1000 п. н.); 2 трэк - специфичный ампликон провирусной ДНК ВЛКРС; 3 трэк - ОКО (контрольный отрицательный образец).

В электрофоретической дорожке, соответствующей положительному контролю (К+), присутствовала светящаяся полоса. Ее электрофоретическая подвижность соответствовала длине ампликона 140 п.н. В электрофоретической дорожке, соответствующей отрицательному контролю (К-), такая полоса отсутствовала. Это свидетельствует о наличии искомого участка провирусной ДНК ВЛКРС.

Для определения чувствительности реакции амплификации с использованием разработанных специфических олигонуклеотидных праймеров и зонда был проведен анализ проб ДНК, выделенных из десятикратных разведений суспензии клеток FLK (вирус продуцирующая культура клеток почки эмбриона овцы, хронически инфицированная вирусом лейкоза КРС). Анализ показал, что последним разведением, в котором проходила ПЦР, является 5 разведение (10^{-5}), что составляет $1,3 \times 10^1$ в.к./мл. Результаты ПЦР в реальном времени представлены в таблице 6 и на рис. 4 по определению чувствительности и специфичности реакции амплификации с использованием разработанных специфических олигонуклеотидных праймеров и зонда, где D 1 - К⁻ - отрицательный контрольный образец; D 2- разведение (10^{-4}); D 3- разведение (10^{-5}); D 4- разведение (10^{-6}); D 5- разведение (10^{-1}); D 6 -разведение (10^{-2}); D 7- разведение (10^{-3}).

Таблица 6. Определение чувствительности разработанных праймеров и олигонуклеотидного зонда

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Rox	Результат
D1	К ⁻		-
D2	4 разведение (10^{-4})	29,2	+
D3	5 разведение (10^{-5})	35,3	+
D4	6 разведение (10^{-6})		-
D5	1 разведение (10^{-1})	27,6	+
D6	2 разведение (10^{-2})	28,0	+
D7	3 разведение (10^{-3})	28,2	+

Для проверки специфичности, разработанные праймеры и зонд проверяли методом ПЦР в реальном времени с использованием следующих образцов ДНК:

1. провирусная ДНК FLK-BLV, выделенной из вирус продуцирующей культуры клеток почки эмбриона овцы (FLK), образец №1;
2. ДНК от здоровых коров, образец №2;
3. провирусная ДНК возбудителя иммунодефицита КРС, образец №3;
4. ДНК герпес вируса возбудителя инфекционного ринотрахеита КРС, образец №4;
5. ДНК E. coli, образец №5;
6. ДНК бактерий рода Salmonella, образец №6.

Положительный результат в ПЦР получили только с образцами ДНК провирусной ДНК FLK-BLV. В остальных пробах ДНК продукт амплификации отсутствовал, приведены в таблице 7 и на рис. 5 представлены результаты ПЦР по определению специфичности разработанных праймеров и зонда, где С 3- провирусная ДНК FLK-BLV, выделенной из вирус продуцирующей культуры клеток почки эмбриона овцы (FLK), образец №1; С 2- отрицательный контрольный образец; С 4 ДНК от здоровых коров, образец №2; С 5 - провирусная ДНК возбудителя иммунодефицита КРС, образец №3; С 6 -ДНК герпес вируса возбудителя инфекционного ринотрахеита КРС, образец №4; С 7-ДНК E. coli, образец №5; С 8-ДНК бактерий рода Salmonella, образец №6.

Таблица 7. Определение специфичности разработанных праймеров и зонда

Идентификатор пробирки		Ср, Rox	Результат
C2	К-		-
C3	образец №1	27,6	+
C4	образец №2		-
C5	образец №3		-
C6	образец №4		-
C7	образец №5		-
C8	образец №6		-

Как видно, из вышеописанных примеров, предложенный способ полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием оригинальных праймеров и зонда позволяет обнаруживать провирусную ДНК возбудителя лейкоза крупного рогатого скота.

Выбор высоко консервативной области гена р24 позволяет повысить специфичность данного способа диагностики лейкоза КРС.

Использование предлагаемых специфических праймеров и зонда повышает чувствительность метода ПЦР по сравнению с прототипом до $1,3 \times 10^1$ в.к./мл.

Предложенный способ апробирован с 2009-2015 гг на многих животноводческих фермах Республики Татарстан на более 500 пробах ДНК, полученных из крови крупного рогатого скота. Приводим один из примеров в таблице - 8 и на рис. 6 по амплификации специфических фрагментов ДНК провируса лейкоза КРС с помощью разработанных праймеров и олигонуклеотидного зонда для диагностики лейкоза КРС, где С 3-К⁻ - отрицательный контрольный образец; С7 - отрицательная проба (кровь теленка неинфицированная вирусом лейкоза КРС); С 5-положительная проба (кровь коровы инфицированная вирусом лейкоза крс); С 9 - К⁺ - положительный контрольный образец.

Таблица 8. Амплификация специфических фрагментов ДНК провируса лейкоза КРС с помощью разработанных праймеров и олигонуклеотидного зонда

Идентификатор пробирки		Ср, Rox	Результат
C3	К-		-
C5	корова	30,8	+
C7	теленки		-
C9	К+	29,7	+

Примечание: С 3-К⁻ - отрицательный контрольный образец; С7 - отрицательная проба (кровь теленка неинфицированная вирусом лейкоза КРС); С 5-положительная проба(кровь коровы инфицированная вирусом лейкоза крс); С 9 - К⁺ - положительный контрольный образец.

Как видно из таблицы 8, предлагаемый способ экспресс-диагностики лейкоза КРС позволяет достоверно обнаруживать провирус лейкоза КРС в клинических образцах.

Предложенный способ неоднократно апробирован на базе лаборатории биохимии и молекулярно-генетического анализа ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань).

Таким образом, предлагаемый достоверный и высокочувствительный способ позволяет сократить время, упростить процесс ранней диагностики лейкоза КРС и выявления вируса лейкоза КРС.

Формула изобретения

Способ экспресс-диагностики лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, включающий использование прямого и обратного олигонуклеотидного праймера, с добавлением в реакционную смесь

олигонуклеотидного зонда с флуоресцентной меткой для выявления фрагмента гена провируса лейкоза крупного рогатого скота, отличающийся тем, что выявляют фрагмент гена р 24 провируса лейкоза крупного рогатого скота и используют в качестве праймеров олигонуклеотиды структуры P_F: 5'-GGCACCGGGTTCGCAAGTAT-3', P_R: 5'-CGGTTAGGCTGGTCATGTGGCC-3', а в качестве олигонуклеотидного зонда - зонд RT р 24 AAACAСТАСGACTTGCAATCTTACAGGCCGAC, меченный с 5'-конца флуоресцентным красителем ROX и с 3'-конца гасителем RTQ2, которые имеют следующие характеристики: отсутствие самокомплементарных участков внутри каждого праймера и между прямым и обратным, температура отжига составляет 61,0°C для P_F, 62,2°C для P_R и 66,4°C для зонда RT и фланкируют область консервативного гена р 24 вируса лейкоза крупного рогатого скота размером 140 пар нуклеотидов, который обнаруживают за счет детекции сигнала флуоресценции.

«Способ экспресс-диагностики лейкоза крупного рогатого скота»

```

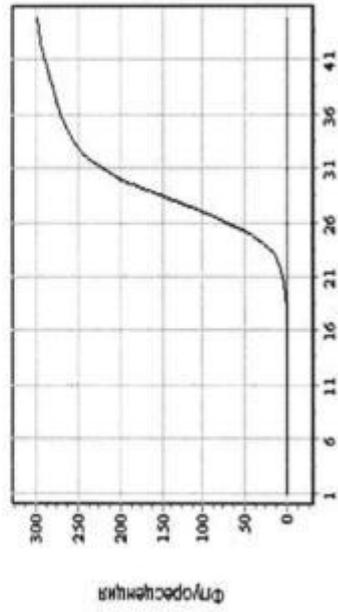
Pr p24_M0100.0% ..... probe RT p24_M0100.0% .....
1  GGCACCGGGT TCGCAAGTAT GGATACAAAC ACTACGACTT GCAATCTTAC AGGCCGACCC TACTCTGCT GACCTAGAAC AACCTTGCCA ATATATTGCT
  CCGTGGCCCA AGCGTTCAIA CCTATGTTG TGAIGCTGAA CGTTAGAAIG ICCGGCTGGG ATGAGGACGA CTGGATCTTG TTGAAACGGT TATATAACGA
101 TCCCGGTGG ATCAAACGGC CCACAATGACC AGCCTAACGG AGCCTAACGC CAGCAATAGC CGCCGCTGAA GCGGCCAATA CCTCCAGGG TTTTAAATCCC CAATATGGGA
  AGGGCCAGC TNGTTGGCCG GGTGTACTGG TCGGATGGCC GTCGTATCG GCGGGACTT CCGCGGTTAT GGGAGGTCCC AATATTAGGG GTTTTACCCT
  ..... Pr p24_M0100.0% .....
201 CCTTGACCCA ACAATCAGCT CAGCCCAACG CCGGGACCT
  GGGACTGGGT TGTTAGTCGA GTGGGTTGC GGCCCTGGA

```

Рис. 1.

«Способ экспресс-диагностики лейкоза крупного рогатого скота»

С7



С3

Номер цикла

Рис. 2.

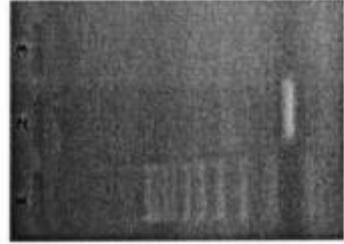


Рис.3.

«Способ экспресс-диагностики лейкоза крупного рогатого скота»

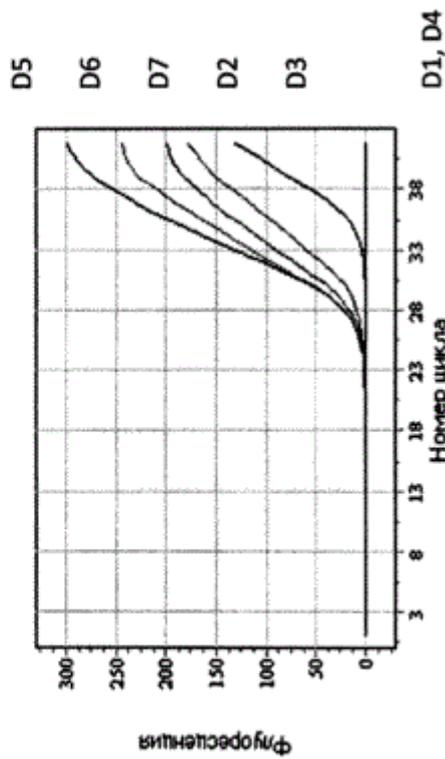


Рис.4.

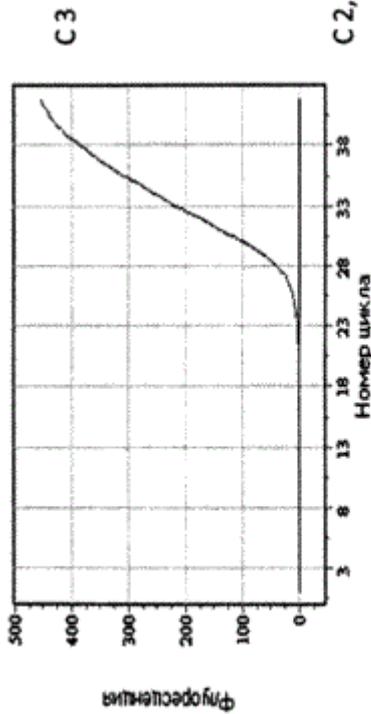


Рис.5.

«Способ экспресс-диагностики лейкоза крупного рогатого скота»

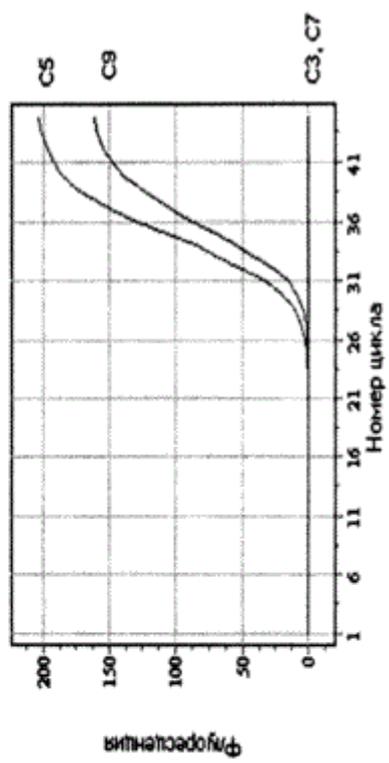


Рис. 6.