

Аналіз наборів праймерів для детекції провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби та вірусу імунодефіциту людини за допомогою полімеразної ланцюгової реакції

О. П. Лиманський^{1,2}, О. Ю. Лиманська²

¹ Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечнікова АМН України
Вул. Пушкінська, 14, Харків, 61057, Україна

² Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН України
Вул. Пушкінська, 83, Харків, 61023, Україна

Здійснено теоретичне та експериментальне порівняння чотирьох наборів праймерів для детекції провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Продемонстровано, що використання праймерів із 100 %-м ступенем гомології для всіх відомих ізолятів ВЛ ВРХ дозволило виявити більшу кількість вірусоспів, ніж праймерів з меншим рівнем гомології, які мають по 2—4 помилкових (неспарених) нуклеотиди. Сформульовано основні положення програми з безвакцинного викоринення ВЛ ВРХ в Україні. Показано, що праймери з комерційного набору для ПЛР-детекції вірусу імунодефіциту людини 1-го типу мають 5—7 помилкових нуклеотидів, що може істотно знижувати якість ПЛР-діагностикуму.

Вступ. Молекулярно-генетичні методи, засновані на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР), знайшли застосування у діагностиці інфекційних та спадкових захворювань людини та тварин, криміналістиці, онкології, аналізі якості продуктів харчування та води, встановленні батьківства та статі майбутньої дитини тощо [1—6]. Завдяки надзвичайно високій чутливості та можливості досягнення 100 %-ї специфічності особливо ефективним виявилось використання ПЛР у діагностиці та моніторингу інфекційних захворювань. Невпинно зростає кількість комерційних ПЛР-тест-систем, які використовуються центрами та лабораторіями молекулярної діагностики для ранньої детекції збудників вірусної та бактеріальної природи. В той же час досі не існує методів оцінки різноманітних ПЛР-діагностикумів, що пропонуються науково-дослідним і клінічним лабораторіям. Актуальним є і питання надійності та якості наборів праймерів —

основних компонентів будь-якої ПЛР-тест-системи, від яких залежать специфічність та ефективність діагностикуму.

Аналіз літературних даних свідчить про те, що, як правило, праймери конструюють на основі множинного вирівнювання без урахування їхніх термодинамічних характеристик — температур плавлення та ентальпії. Інший підхід до вибору праймерів базується на знанні послідовності геному одного ізоляту. Обидва ці методи є недосконалими і за їхньою допомогою можна створювати лише низькоспецифічні ПЛР-тест-системи, що підвищує відсоток помилково позитивних і помилково негативних результатів аналізу внаслідок низького ступеня гомології праймерів.

Розроблений та запропонований в цій роботі підхід дозволяє не тільки оцінити якість та ефективність існуючих ПЛР-тест-систем, зокрема праймерів, але й конструювати високоспецифічні та надійні ПЛР-діагностикуми.

Матеріали і методи. Для аналізу баз даних нуклеїнових кислот EMBL, GenBank, DDBJ вико-

ристано ліцензійний пакет прикладних програм GeneBee, розроблений колективом авторів під керівництвом проф. Л. І. Бродського (МДУ, Інститут фізико-хімічної біології ім. О. М. Белозерського, Росія) та направлений на вирішення теоретичних задач молекулярної біології [7]. Визначення праймерів на основі їхніх температур плавлення та ентальпії здійснено методом ітерацій за допомогою програми Oligo [8].

Для детекції провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) у роботі використано такі праймери: OBLV9 — 5'-GTG CCA AGT CTC CCA GAT ACA-3'; OBLV10 — 5'-TAT AGG ACA GTC TGG GAA GGC-3'; ENV5 — 5'-CCC CGT GTG GGT TCC CTG GCG-3'; ENV6 — 5'-CAA ACC GGC GCC GCC CTT GTG-3'; BLV1 — 5'-GGG CCT TCC CAG ACT GTG CTA TAT GTT GG-3'; BLV2 — 5'-GTC GGC GAT GTA CAA CCA ATC TTCGGG-3'; BLV3 — 5'-ACC CAA GGA TGG CAC CAC CCT TCC CAG-3'; BLV4 — 5'-GCA CCT TCA GGG AGG TGA GTC TCT CTA CCG-3'; ENV1 — 5'-TCT gTg CCA AgT CTC CCA gATA-3'; ENV2 — 5'-CCA ACA Agg gCg gCg CCg gTTT-3'; ENV3 — 5'-gCg Agg CCg ggT CCA gAg CTgg-3'; ENV4 — 5'-AAC AAC AAC CTC Tgg gAA ggT-3'; Праймери OBLV9-OBLV10 та ENV5-ENV6 люб'язно надані д-ром Олофсоном (Інститут ветеринарії, Швеція) та д-ром Моллойем (Інститут тваринництва, Австралія) відповідно, а праймери ENV1-ENV4 — д-ром Кузмаком (Інститут ветеринарії, Польща). Розроблені авторами праймери BLV1-4 [9] синтезовано на синтезаторі «Applied Biosystems» Model 380 (США) і очищено за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії.

Лімфоцити периферичної крові ВРХ віком 6—24 місяця з двох неблагополучних щодо лейкозу господарств Харківської області використано як клінічний матеріал при проведенні ПЛР. Клітинний лізат готували по методу [10].

Однораундову ПЛР з набором праймерів OBLV9-OBLV10 проведено відповідно до [11], з набором праймерів ENV5-ENV6 — відповідно до [12], а з набором праймерів ENV1-ENV4 — до [13]. З наборами праймерів BLV1-4 здійснено гніздову ПЛР на ампліфікаторах НВО «Точність» та компанії «Біоком» (Росія), загальний об'єм реакційної суміші складав 50 мкл. При проведенні гніздової ПЛР перший етап ампліфікації з зовнішніми праймерами BLV1-BLV2 проходив за таких температурних та часових режимів: денатурація — 94 °С, 1 хв, відпал — 66 °С, 1,3 хв, синтез — 74 °С, 1 хв протягом 40 циклів. Після останнього циклу ампліфікації 10 мкл суміші відбирали для проведення другого етапу ампліфікації з набором внут-

рішніх праймерів BLV3-BLV4 за таких оптимальних умов: денатурація — 94 °С, 1 хв, відпал — 72 °С, 1,3 хв, синтез — 74 °С, 1 хв. Продукти ампліфікації детектували за допомогою електрофорезу в 1,5 %-му агарозному гелі, що містив бромистий етидий.

Плазмиду *pBLV344*, яка містила провірусну ДНК вірусу лейкозу (ВЛ) ВРХ, та культуру клітин нирки ембріонів вівці, інфіковану ВЛ ВРХ, використано як позитивний контроль. ДНК фага λ , оброблену рестриктазами *HindIII*, *EcoRI*, *EcoRV*, використовували як маркер молекулярної маси.

Реакцію імунодифузії в агарі (РІД) проведено для індивідуальних зразків сироватки крові ВРХ згідно з рекомендаціями виробника (ІЕКВМ). Тест дозволяє виявити наявність специфічних антитіл до глікопротеїну gp51 ВЛ ВРХ.

Результати і обговорення. Одними з основних критеріїв високоякісної системи ПЛР-праймерів є близькість їхніх температур плавлення (і, отже, температур відпалу) та ступінь гомології. Термін «100 %-й ступінь гомології» означає, що в комплексі праймер—однонитковий амплікон немає помилкових, тобто неспарених, нуклеотидів. У більшості випадків при виборі праймерів автори не враховують можливість існування таких помилок, виходячи, таким чином, із 100 %-го ступеня гомології при встановленні температурного режиму проведення ампліфікації. Неправильний вибір температури відпалу призводить до помилково негативного результату ПЛР-аналізу, тобто зниження специфічності та надійності ПЛР-діагностикуму. Як показано раніше [8], в разі появи одного помилкового нуклеотиду в комплексі праймер—однонитковий продукт температуру відпалу праймерів необхідно знизити на 4—5 °С, двох помилкових нуклеотидів — на 8 °С і т. д. Таким чином, між ступенем гомології праймерів та їхньої температурою відпалу, з одного боку, і надійністю та точністю ПЛР, з іншого, існують причинно-наслідкові відносини.

Для забезпечення високого ступеня гомології праймерів і оптимальної температури відпалу вибір праймерів необхідно здійснювати на основі проведення множинного вирівнювання секвенованих послідовностей геному ізолятів інфекційного збудника. Цей підхід обрано нами при конструюванні наборів праймерів для ранньої детекції провірусної ДНК ВЛ ВРХ. Для виявлення висококонсервативних локусів гена *env* ВЛ ВРХ, з яких у подальшому вибирають праймери, нами проведено множинне вирівнювання присутніх у базах даних EMBL і GenBank 11 ізолятів цього гена.

На рис. 1, а, наведено фрагмент такого мно-

1 AF033818	CACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAAT
2 AF067081	CACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAAT
3 S83530	CACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTcCCTCCCTGGGCTCCCGAgAT
4 M35238	CACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACcTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAAT
5 M35239	CACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAAT
6 M35240	CACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAAT
7 M35242	CACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAAT
8 D00647	CACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAAT
9 K02120	CACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAAT
10 K02251	CACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAAT
11 AF257515	CACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAAT
a	5'-GGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGG-3' (BLV1)
1 AF033818	TGGACTtcGTAATGGtTATCCTAAGATCTAtTGGCCCCCCCCACAAGGGCGGcCGCCGGTT
2 AF067081	TGGACTttGTAATGGtTATCCTAAGATCTAtTGGCCCCCCCCACAAGGGCGGGCGCCGGTT
3 S83530	TGGACTtcGTAATGGtTATCCTAAGATCTACTGGCCCCCCCCACAAGGGCGGcCGCCGGTT
4 K02120	TGGACTCTGTAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGCCCCCCCCACAAGGGCGGGCGCCGGTT
5 K02251	TGGACTtcGTAATGGtTATCCTAAGATCTAtTGGCCCCCCCCACAAGGGCGGGCGCCGGTT
6 D00647	TGGACTCTGTAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGCCCCCCCCACAAGGGCGGGCGCCGGTT
7 M35238	TGGACTtTGTAATGGtTATCCTAAGATCTAtTGGCCCCCCCCACAAGGGCGGGCGCCGGTT
8 M35239	TGGACTCTGTAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGCCCCCCCCAaAAGGGCGGGCGCCGGTT
9 M35240	TGGACTtTGTAATGGtTATCCTAAGATCTAtTGGCCCCCCCCACAAGGGCGGcCGCCGGTT
10 M35242	TGGACTCTGTAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGCCCCCCCCACAAGGGCGGGCGCCGGTT
11 AF257515	CACGGGccTCCCAGACTGTGCTATATGTTGgGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAAT
b	5'-ctGTAATGGcTATCCTAAGATCTAcTGGC-3' (OBLV11)
1 S83530	TTTCTGTGCCAgGTCTCCCAGATACACCTTGGACTTCGTAATGGTTATCCTAAGATCTAC
2 K02120	TTTCTGTGCCAAGTCTCCCAGATACACCTTGGACTCTGTAATGGCTATCCTAAGATCTAC
3 K02251	TTTCTGTcCCAgtGTCTCCCAGATACACCTTGGACTTCGTAATGGTTATCCTAAGATCTAT
4 D00647	TTTCTGTGCCAAGTCTCCCAGATACACCTTGGACTCTGTAATGGCTATCCTAAGATCTAC
5 M35238	TTTCTGTcCCAgtGTCTCCCAGATACACCTTGGACTTTGTAATGGTTATCCTAAGATCTAT
6 M35239	TTTCTGTGCCAAGTCTCCCAGATACACCTTGGACTCTGTAATGGCTATCCTAAGATCTAC
7 M35240	TTTCTGTcCCAgtGTCTCCCAGATACACCTTGGACTTTGTAATGGTTATCCTAAGATCTAT
8 M35242	TTTCTGTGCCAAGTCTCCCAGATACACCTTGGACTCTGTAATGGCTATCCTAAGATCTAC
9 AF067081	TTTCTGTcCCAgtGTCTCCtAGATACACCTTGGACTTTGTAATGGTTATCCTAAGATCTAC
10 AF033818	TTTCTGTcCCAgtGTCTCCCAGATACACCTTGGACTTTGTAATGGTTATCCTAAGATCTAC
11 AF257515	TTTCTGTGCCAAGTCTCCCAGATACACCTTGGACTTTGTAATGGCTATCCTAAGATCTAC
c	5'-TCTGTgCCAaGTCTCCCAGATA-3' (ENV1)

Рис. 1. Множинне вирівнювання фрагментів *env* гена 11 ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) з баз даних EMBL, GenBank та DDBJ. Сірі смуги під секвенованими послідовностями вказують на наявність висококонсервативних локусів, а провал — на помилкові нуклеотиди у комплексі праймер—однонитковий амплікон. Помилкові (неспарені) нуклеотиди показано маленькими літерами. Розроблений нами праймер BLV1 (a) має 100 %-й ступінь гомології для всіх відомих ізолятів ВЛ ВРХ; OBLV11 (b), ENV1 (c) — праймери з різних наборів для ПЛР-детекції провірусної ДНК ВЛ ВРХ — мають чотири та три помилкових нуклеотиди для окремих ізолятів відповідно

жинного вирівнювання. BLV1 — це послідовність одного з запропонованих нами праймерів для детекції ВЛ ВРХ. На рис. 1, б, в, представлено фрагменти аналогічного аналізу, проведеного для деяких праймерів, що використовуються в різних лабораторіях для ранньої діагностики лейкозу: OBLV11 і ENV1 — праймери, сконструйовані у Національних інститутах ветеринарії Швеції та Польщі відповідно. Провали на сірих смугах, наведених під послідовностями, свідчать про наявність помилкового нуклеотиду в даній позиції і, отже, про зменшення ступеня гомології праймерів для окремих ізолятів. Так, комплекс OBLV11—однонитковий амплікон має три помилки для ізолятів S83530, M35238, M35240, чотири помилки — для ізоляту D00647. Для інших ізолятів праймер OBLV11 має 100 %-й ступінь гомології (рис. 1, б). При проведенні ПЛР авторами роботи [11] температурний режим обрано, виходячи виключно із 100 %-го ступеня гомології без урахування можливих помилок у комплексі праймер—однонитковий продукт. Тому існує вірогідність отримання помилково негативних результатів ПЛР-аналізу, оскільки не всі відомі варіанти ВЛ ВРХ будуть виявлені. Праймер OBLV11 може бути використано для детекції ВЛ ВРХ за умов зменшення його температури відпалу на 12 °С (за наявності трьох помилок) або 16 °С (для чотирьох помилок). Однак при цьому можлива ампліфікація неспецифічних продуктів, поява яких ускладнює інтерпретацію результатів аналізу.

Аналогічну ситуацію маємо і для праймера ENV1 (рис. 1, в): наявність двох помилкових нуклеотидів у комплексах ENV1—M35240, ENV1—M35238, ENV1—K02251, ENV1—A033818 та трьох помилкових нуклеотидів у комплексі ENV1—AF067081 означає, що для успішної ПЛР-детекції цих ізолятів температуру відпалу необхідно знизити на 8 та 12 °С відповідно.

Праймер BLV1, як і всі сконструйовані нами праймери BLV1—4 для ранньої детекції ВЛ ВРХ, має 100 %-й ступінь гомології для всіх відомих зараз ізолятів ВЛ ВРХ (рис. 1, а) і, отже, характеризується 100 %-ю специфічністю при виявленні цього інфекційного збудника.

Результати теоретичного порівняння ступеня гомології і специфічності деяких відомих на цей час ПЛР-праймерів, що використовуються для виявлення провірусної ДНК ВЛ ВРХ, наведено в табл. 1.

Нами проведене не лише теоретичне, а й експериментальне порівняння різних наборів праймерів, яке підтвердило раніше зроблений висновок про більш високі чутливість і специфічність сконструйованих нами праймерів BLV1—4. Частину

Таблиця 1

Набори праймерів для виявлення вірусу лейкозу великої рогатої худоби та вірусу імунодефіциту людини

Праймер	Положення праймеру	Кількість помилок	Ступінь гомології
BLV1	5440—5468	—	100
BLV2	5955—5929	—	100
BLV3	5592—5618	—	100
BLV4	5832—5803	—	100
ENV5	4738—4758	—	100*
ENV6	5121—5101	2	90
ENV7	4908—4928	—	100*
ENV8	5048—5028	2	90
OBLV9	5035—5055	2	90
OBLV10	5462—5442	—	100
OBLV11	5065—5094	4	87
OBLV12	5305—5476	1	97
ZM1	4907—4932	—	100*
ZM2	5787—5812	1	96
ZM3	5473—5495	3	86
SK38**	1544—1571	7	75
SK39**	1631—1658	5	82
ENV1	5032—5053	2	91
ENV4	5608—5629	0	100
ENV2	5099—5120	1	95
ENV3	5521—5542	2	91

П р и м і т к а. *Ступінь гомології визначено на основі консенсусу для трьох ізолятів ВЛ ВРХ. Для інших праймерів множинне вирівнювання проведено для 10 ізолятів ВЛ ВРХ; **положення праймера на геномі ізоляту HIV-1 HIAF4394.

результатів ПЛР-аналізу лімфоцитів периферичної крові ВРХ на наявність провірусної ДНК вірусу лейкозу, здійсненого з використанням чотирьох пар праймерів, а також результатів виявлення антитіл до ВЛ ВРХ за допомогою РІД, наведено в табл. 2—4. З табл. 4 можна бачити, що результати восьми аналізів з 10 проб для пар праймерів ENV1-ENV4 та BLV3-BLV4 збігаються, тобто для 80 % зразків ПЛР-детекції з двома незалежними тест-системами отримано надійні результати. Меншу кількість ПЛР-позитивних зразків, виявлених за допомогою пари праймерів ENV1-ENV4, можна пояснити, на нашу думку, наявністю помилкових (тобто неспарених) нуклеотидів у послідовностях цих праймерів. З іншого боку, порівняння результатів ПЛР-детекції та РІД свідчить про високу кількість (50 %) помилково позитивних резуль-

Таблиця 2

Результати ПЛР-детекції лімфоцитів крові великої рогатої худоби на наявність провірусної ДНК вірусу лейкозу з різними наборами праймерів

Праймер	Номер тварини						
	31	32	33	34	35	36	37
OBLV9-OBLV10	+	-	-	-	-	+	нт
BLV3-BLV4	-	+	+	-	+	+	+
ENV5-ENV6	-	+	+	-	+	+	-

Примітка. «+» — позитивний результат ПЛР-аналізу (наявність ВЛ ВРХ); «-» — негативний результат ПЛР-аналізу; «нт» — тестування не проводили. BLV3-BLV4 — праймери з Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН; ENV5-ENV6 — праймери з Інституту тваринництва Австралії; OBLV9-OBLV10 — праймери з Національного інституту ветеринарії Швеції.

Таблиця 3

Результати ПЛР-детекції лімфоцитів крові бичків на наявність провірусної ДНК вірусу лейкозу з різними наборами праймерів

Номер	Вік тварин				
	6 місяців			9 місяців	
	BLV3-BLV4	BLV3-BLV4	OBLV11-OBLV12	BLV3-BLV2	BLV1-BLV4
21	+	+	-	+	+
22	±	+	нт	+	+
23	-	-	-	+	+
24	+	+	нт	+	+
25	-	-	-	+	+
26	-	-	нт	+	нт
27	-	-	нт	+	нт
28	-	-	нт	+	нт
FLK	+	+	+	+	+
H ₂ O	-	-	-	-	-

Примітка. «+» — позитивний результат ПЛР-аналізу (наявність ВЛ ВРХ); «-» — негативний результат ПЛР-аналізу; «±» — сумнівний результат ПЛР-аналізу; «нт» — тестування не проводили; FLK — позитивний контроль (культура клітин нирки ембріона вівці, інфікована ВЛ ВРХ); H₂O — негативний контроль (на наявність контамінації).

татів за допомогою РІД, традиційного серологічного методу індикації ВЛ ВРХ через виявлення антитіл до цього збудника.

Розроблені нами молекулярно-генетичні тест-системи на основі ПЛР можуть стати фундаментом національної програми безвакцинного викорінення лейкозу в Україні, оскільки вони вирішують проблему створення методу раннього виявлення сіль-

Таблиця 4

Результати виявлення провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) за допомогою ПЛР-детекції з наборами праймерів ENV1-ENV4 і BLV3-BLV4 та детекції антитіл до ВЛ ВРХ за допомогою реакції імунодифузії (РІД)

Номер тварини	ENV1-ENV4	BLV3-BLV4	РІД
1	-	-	-
2	-	-	+
3	-	-	+
4	-	-	+
5	+	+	+
6	-	+	+
7	+	+	+
8	-	-	+
9	-	+	+
10	-	-	+

Примітка. «+» — позитивний результат ПЛР-аналізу (наявність ВЛ ВРХ); «-» — негативний результат ПЛР-аналізу. BLV3-BLV4 — праймери, розроблені авторами; ENV1-ENV5 — праймери з Інституту ветеринарії Польщі.

ськогосподарських тварин, інфікованих ВЛ, які є джерелом розповсюдження інфекції і не можуть бути виявлені за допомогою традиційних методів — реакції імунодифузії та імуноферментного аналізу.

Основними напрямками такої програми повинні бути: 1) припинення розповсюдження вірусу лейкозу ВРХ всередині стад та між стадами; 2) виявлення всіх інфікованих стад та тварин; 3) вибракування всіх інфікованих тварин.

Аналіз особливостей організації геному та екс-

1 AIARV2	AAATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATCTATAAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAT
2 HI1U1205	AAATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATTTATAAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAT
3 HI1U2348	AAATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATCTATAAAAAGATGGATAATCCTAGGATTAAT
4 HIAF4394	AAATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATTTATAAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAT
5 HIU190	AGg _c AA _c CCACC _c ATCCCAGT _g GGAGA _c ATCTATAAAAAGATGGATGATCCTGGGATTAAT
6 HIU43141	AAATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATATATAAGAGATGGATAATCCTGGGATTAAT
7 HIU46016	AGg _g AA _c CCACCT _g TtCCAGT _g GGAGA _c ATCTATAAAAAGATGGATAATCCTGGGGCTAAAT
8 HIUU5118	AAA _c AATCCACCTATCCCAGT _g GGAGA _c ATCTATAAAAAGGTGGATAATCCTGGGATTAAT
9 HIUU5295	AAATAA _c CCACCT _g TCCCAGTAGGAGA _c ATCTATAAAAAGATGGATAATCTGGGGTAAAT
10 HIVBRUCG	AAATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATTTATAAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAT

5'atAAtCCACctaTcCCAGTaGGAGAAAT-3' (SK38, Perkin Elmer, США)

Рис. 2. Фрагмент множинного вирівнювання гена *gag* 10 ізолятів вірусу імунodefіциту людини (HIV-1). SK38 — праймер з набору для ПЛР-детекції HIV-1 фірми «Perkin Elmer» (США). Для ізолятів NN5-9 ВЛ1-1 SK38 має 3—7 помилкових (некомплементарних) нуклеотидів, які показано маленькими літерами

пресії ВЛ ВРХ як представника родини ретровірусів дозволив сформулювати загальні санітарні правила, яких, на нашу думку, необхідно дотримуватися фермерам для запобігання розповсюдження лейкозу ВРХ: промивка взуття у дезінфікуючих розчинах, зміна захисних накидок при відвідуванні кожної наступної ферми; використання стерильного обладнання для кожної обробки; планування розкладу дня таким чином, щоб відвідувати ферми з інфікованими тваринами наприкінці дня; купівля тільки тестованих тварин або тварин із сертифікатом здоров'я тощо.

Велике значення для успішного виконання програми, безумовно, має рівень знань фермерів та персоналу, який контактує з тваринами. Відомо [14, 15], що горизонтальний шлях передачі ВЛ обумовлено, зокрема, ятрогенним способом, а саме: порушеннями правил асептики під час ветеринарно-зоотехнічних маніпуляцій з тваринами — користуванням шприцями, голками та іншими хірургічними інструментами, що контаміновані кров'ю; при обрізанні рогів, татуюванні чи ректальних дослідженнях; при доїнні хворих і здорових тварин одним і тим же апаратом. Таким чином, обов'язковою умовою викорінення лейкозу ВРХ в Україні є необхідність виконання загальних санітарних правил, головним з яких є використання стерильного обладнання для кожної обробки.

Запропонований підхід до оцінювання якості ПЛР-діагностикумів застосовано нами і для визначення ступеня гомології і, отже, специфічності праймерів SK38 (5'-ATA ATC CAC STA TCC CAG

TAG GAG AAA T-3') та SK39 (5'-TTT GGT CCT TGT CTT ATG TCC AGA ATG C-3'), розроблених фірмою «Perkin Elmer» (США) — одним з лідерів у галузі виробництва реагентів і приладів для проведення ПЛР — для ранньої детекції вірусу імунodefіциту людини 1-го типу (HIV-1).

На рис. 2 наведено фрагмент множинного вирівнювання 10 ізолятів HIV-1, присутніх у базах даних EMBL, GenBank і DDBJ. Видно, що для шести ізолятів праймер SK38 має 100 %-й ступінь гомології. Для інших ізолятів (HIV190, HIV46016, HIVV5118, HIVV5295) комплекс SK38—одонитковий амплікон має 3—7 помилкових нуклеотидів і відповідно низький ступінь гомології (табл. 1). Наявність двох неспарених нуклеотидів на 5'-кінці смислового праймеру SK38 (рис. 2) ускладнює відпал праймеру, і, як наслідок, зростає вірогідність помилково негативного результату аналізу.

Множинне вирівнювання, проведене для антисмислового праймера SK39, продемонструвало наявність п'яти неспарених нуклеотидів у комплексі SK39—одонитковий амплікон і дозволило зробити висновок про його також невисокий ступінь гомології. Таким чином, набір праймерів SK38-SK39 має відносно невисоку специфічність для детекції провірусної ДНК HIV-1, оскільки на цей час існують такі його ізоляти, які неможливо виявити за допомогою цього діагностикуму.

Висновки. Таким чином, зроблене в роботі теоретичне та експериментальне порівняння наборів праймерів для детекції ретровірусів людини і тварин виявило, що за допомогою даної технології

можна оцінювати якість існуючих діагностиків для ПЛР-детекції інфекційних збудників. За допомогою комп'ютерного аналізу показано, що комерційні набори праймерів для ПЛР-детекції HIV-1 характеризуються наявністю 5—7 помилкових нуклеотидів, що може призводити до помилково негативних результатів аналізу. Продемонстровано, що наявність помилкових нуклеотидів у комплексі праймер—одонитковий продукт ПЛР спричинює зменшення точності ПЛР-детекції. Чим нижчий ступінь гомології праймерів, тим менша точність стандартного варіанту ПЛР-детекції з даним набором праймерів. Експериментальне порівняння детекції провірусної ДНК ВЛ ВРХ за допомогою ПЛР з різними наборами праймерів та детекції антитіл до ВЛ ВРХ за допомогою РІД показало, що ПЛР-аналіз має більшу надійність і точність відносно традиційного серологічного тесту — реакції імунодифузії в агарі. Створені праймери, що мають 100 %-ву гомологію для всіх відомих ізолятів ВЛ ВРХ, можуть бути рекомендовані Міжнародному епізоотологічному бюро як стандартний набір праймерів для раннього виявлення провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби за допомогою ПЛР.

A. P. Limansky, O. Yu. Limanskaya

Analysis of primer sets for the PCR-detection of provirus DNA of bovine leukemia virus and human immunodeficiency virus

Summary

Theoretical and experimental comparison of four primer sets for the bovine leukemia virus (BLV) detection by the polymerase chain reaction (PCR) is carried out. Primers with 100 % homology for all known BLV isolates are shown to be more effective in detecting BLV infected cattle than primers with lower homology which have 2—4 mismatched (unpaired) nucleotides. Main items of BLV eradication programme without vaccination in Ukraine are presented. The primers from commercially available kit for the HIV-1 PCR detection are shown to have 5—7 mismatched nucleotides that could make worse PCR primer set.

A. П. Лиманский, О. Ю. Лиманская

Анализ наборов праймеров для детекции провірусної ДНК вірусу лейкоза крупного рогатого скота і вірусу імунодефіцита людини з допомогою полімеразної ланцюгової реакції

Резюме

Проведено теоретичне і експериментальне порівняння чотирьох наборів праймерів для детекції провірусної ДНК вірусу лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС) з допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Продемонстровано, що праймери з 100 %-ю ступенню гомології для всіх відомих ізолятів ВЛ КРС дозволили виявити більше кількість вірусоносителей, ніж праймери з меншим рівнем гомології, які мають по 2—4 помилкових (неспарен-

ных) нуклеотида. Сформулированы основные положения программы по безвакциному искоренению ВЛ КРС в Украине. Показано, что праймеры из коммерческого набора для ПЦР-детекции вируса иммунодефицита человека 1-го типа имеют 5—7 ошибочных нуклеотидов, что может существенно снизить качество ПЦР-диагностики.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Grant K. A., Kroll R. G. Molecular biology techniques for the rapid detection and characterization of food borne bacteria // Food Sci. and Technol. Today.—1993.—7, N 2.—P. 80—85.
2. Tougianidou D. Use of PCR for the routine detection of viruses in drinking water and bathing water // Zentralbl. Hyg. und Umweltmed.—1993.—194, N 5—6.—P. 440.
3. Schlunk B., Rziha H.-J. Detection of food-borne viruses by the polymerase chain reaction // Rev. Med. Vet.—1994.—145, N 3.—P. 215—216.
4. Puskas L. G., Fartman B., Bottka S. Restricted PCR: amplification of an individual sequence flanked by a highly repetitive element from total human DNA // Nucl. Acids Res.—1994.—22, N 15.—P. 3251—3252.
5. Gopalakrishna V., Srivastava A. N. Detection of human papillomavirus DNA sequences in cancer of the urinary bladder by *in situ* hybridization and polymerase chain reaction // Genitourin. Med.—1995.—71, N 4.—P. 231—233.
6. Рысков А. П., Гордон И. О. Полиморфизм ДНК и геномная дактилоскопия // Биотехнология.—1992.—№ 3.—С. 3—11.
7. Бродский Л. И., Драчев А. Л., Тамузов Р. Л., Чумаков К. М. Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneVec // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 1.—С. 10—14.
8. Rychlik W., Spencer W. J., Rhoads R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro* // Nucl. Acids Res.—1990.—18, N 21.—P. 6409—6417.
9. Лиманская О. Ю., Лиманский А. П., Нехороших Е. М., Бусол В. А., Цымбал В. И. Детекция вируса лейкоза крупного рогатого скота с использованием полимеразной цепной реакции // Вісн. аграр. науки.—1999.—№ 9.—С. 35—39.
10. Лиманская О. Ю., Лиманский А. П., Безуглый Н. Д. Определение пола преимплантационных эмбрионов сельскохозяйственных животных с помощью полимеразной цепной реакции // Биотехнология.—2000.—№ 2.—С. 66—72.
11. Klintevall K., Ballagi-Pordany A., Naslund K., Belak S. Bovine leukaemia virus: Rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves // Vet. Microbiol.—1994.—42.—P. 191—204.
12. Eaves F. W., Molloy J. B., Dimmock C. K., Eaves L. E. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle // Vet. Microbiol.—1994.—39.—P. 313—321.
13. Beier D., Blankenstein P., Marquardt O., Kuzmak J. Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RELPA and DNA sequencing // Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.—2001.—114.—P. 252—256.
14. Ковалюшко В. Щоб відступав лейкоз // Ветеринар. медицина України.—1996.—№ 5.—С. 9—11.
15. Сюрин В. Н., Самуйленко А. Я., Соловьев Б. В., Фомина Н. В. Вирусные болезни животных.—М.: ВНИТИБП, 1998.—928 с.

УДК 619:616.98:578.828.11
Надійшло до редакції 22.10.01