

*Шыныбекова Г.О., Кожабергенов Н.С., Акылбаева К.К., Садикалиева С.О.,
Исабек А.У., Сандыбаев Н.Т., Султанкулова К.Т.*

**КАНАТТУУЛАРДЫН ВИРУСТУК ООРУЛАРЫН
ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКАЛОО ҮЧҮН МИКРОЧИП ЗОНДОРУНУН
ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯСЫНЫН САНДЫК МААНИСИ**

*Шыныбекова Г.О., Кожабергенов Н.С., Акылбаева К.К., Садикалиева С.О.,
Исабек А.У., Сандыбаев Н.Т., Султанкулова К.Т.*

**МЕДИАННЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЗОНДОВ МИКРОЧИПА ДЛЯ
ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПТИЦ**

*G.O. Shynybekova, N.S. Kozhabergenov, K.K. Akylbaeva, S.O. Sadikalieva,
A.U. Isabek, N.S. Sandybaev, K.T. Sultankulova*

**MEDIAN VALUES OF FLUORESCENCE OF MICROARRAY PROBES FOR EXPRESS
DIAGNOSTICS OF VIRAL DISEASES OF BIRDS**

УДК: 57.083.2:578.223

Бул макалада канаттуулардын вирустук ооруларын экспресс-диагностикалоо үчүн микрочип зондорунун флуоресценциясынын сандык маанисин баалоодогу жыйынтыктар көрсөтүлгөн. Микрочиптерди сканерлөө жыйынтыгында белгилүү зондорго тиешелүү үч чекиттин флуоресценциясынын мааниси аныкталды.

Негизги сөздөр: микрочип, гибридизация, зонд, диагностика, олигонуклеотид.

В данной работе представлены результаты оценки медианных значения флуоресценции зондов микрочипа для экспресс-диагностики вирусных болезней птиц. По результатам сканирования микрочипов определяли значения флуоресценции трех точек, соответствующих определенному зонду, исключая величину флуоресценции фона, выраженные в относительных единицах.

Ключевые слова: микрочип, гибридизация, зонд, диагностика, олигонуклеотид.

In present, article the results of the evaluation of the median fluorescence values of microchip probes for express diagnostics of viral diseases of birds. Based on the results of microchip scanning, the fluorescence values of three points corresponding to a specific probe were determined, excluding the background fluorescence value, expressed in relative units.

Key words: microarray, hybridization, probe, diagnostics, oligonucleotide.

Введение

На сегодняшний день для птицеводства высокую опасность представляют вирусные болезни птиц, как болезнь Ньюкасла, грипп птиц, инфекционный бронхит птиц, инфекционный бурсит кур и др. Постоянные вспышки инфекции в сопредельных государствах повышают риск заноса инфекции на территорию Республики Казахстан.

Методы ранней диагностики являются одним из важных направлений на пути борьбы с инфекционными заболеваниями. Внедрение новой методологии, идущей на смену традиционным подходам, наметило следующий шаг в совершенствовании лабораторной

вирусологической диагностики – создание микрочипов (биочипов), благодаря которой стала доступной экспресс-диагностика многих особо опасных инфекций.

Биологические микрочипы – это один из новейших инструментов биологии и медицины XXI века. Микрочипы были изобретены в конце 90-х годов в России и США. В настоящее время они активно производятся многими зарубежными биотехнологическими фирмами [1].

Наиболее популярны в настоящее время микрочипы на основе ДНК, ставшие по-настоящему революционной технологией в биомедицине. Определяющей технологической идеей стало применение стеклянной подложки для нанесения генетического материала, что сделало возможным помещать на нее ничтожно малые его количества и очень точно определять местоположение конкретного вида тестируемой ДНК. Для приготовления микрочипов стали использоваться роботы, применяемые прежде в микроэлектронике для создания микросхем [2-4].

Целью работы является оценка медианных значений флуоресценции зондов микрочипа для экспресс-диагностики возбудителей птичьих инфекции.

Материалы и методы.

Объектами исследований являются возбудители птичьих инфекций – вирусы гриппа птиц, болезни Ньюкасла, инфекционного бурсита кур, инфекционного бронхита птиц.

Подбор и синтез олигонуклеотидных ген специфичных праймеров и зондов. Специфические праймеры для каждого зонда подбирались с помощью программы Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) в международной базе данных GenBank. Синтез олигонуклеотидных зондов и праймеров проводили на оборудовании фирмы K&A Laborgeraete, модели DNA/RNA Synthesizer H-16 (производство Германия), согласно инструкции производителя.

Печать микрочипа. Олигонуклеотидные зонды разводили 1:1 с 2-х кратным буфером для печати олигонуклеотидов (производства «Arrayit corporation», США), в концентрациях ~ 50 пикомоль наносили на альдегидный субстрат («Arrayit corporation», США) и на стеклянные слайды без подложки («Sigma», США) методом контактной печати с использованием спот-принтера Nano Print LM60 («Arrayit corporation», США).

Выделение РНК вирусов. Тотальную РНК экстрагировали из материала реагентом Trizol (Invitrogen) и набором для выделения РНК фирмы Qiagen в соответствии с инструкциями производителя. Качество и концентрацию полученных РНК проверяли на спектрофотометре.

ОТ-ПЦР с флуоресцентным мечением кДНК вирусов. Флуоресцентное мечение кДНК вирусов осуществляют во время проведения реакции обратной транскрипции (ОТ) на матрице РНК вирусов, и амплификации кДНК (ПЦР) в присутствии флуоресцентно меченых нуклеотидов, с использованием специфичных праймеров, подобранных к зондам.

Гибридизация меченой нуклеиновой кислоты с зондами на биочипе. Гибридизация кДНК с олигонуклеотидными зондами на микрочипе основывается на комплементарности взаимодействия цепей нуклеиновых кислот. Нарботанные флуоресцентно меченые ПЦР продукты разводят с буфером для гибридизации, который состоит из щёлочи - формамида, SCC и SDS буферов. Путем нагревания и обработки щелочью двухцепочечную кДНК разделяли на отдельные цепи. Денатурированную кДНК инкубируют на

микрочипе в термошейкере при 37°C и 350 об/мин в течение 2-3 ч.

Флуоресцентное сканирование. Статистическая обработка результатов. Флуоресцентное сканирование микрочипа проведено на сканере InnoScan-710AL с разрешением 5 мкм, при длинах волн 532 нм и 633 нм. Полученные данные обрабатывались с помощью программного обеспечения Marix ver. 5.5.0. С использованием данной программы произведена детекция зондов по интенсивности флуоресцентного свечения с количественными выходными данными. За положительный результат принимали сигнал, превышающий фоновое значение.

Результаты и обсуждение.

Для получения статистически достоверных данных результаты сканирования обрабатывались с помощью программного обеспечения Marix 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 калькуляция интенсивностей флуоресцентного свечения зондов с количественными выходными данными. В качестве результативных данных использовали медианные значения флуоресценции зондов за вычетом сигнала фона, выраженные в относительных единицах.

Для количественной оценки регистрируемого сигнала, получаемого после гибридизации на микрочипе, проводили расчет величины интенсивности флуоресценции каждой точки с помощью программы Marix ver. 5.5.0 (табл. 1).

Таблица 1

Расчет медианных значений флуоресценции зондов.

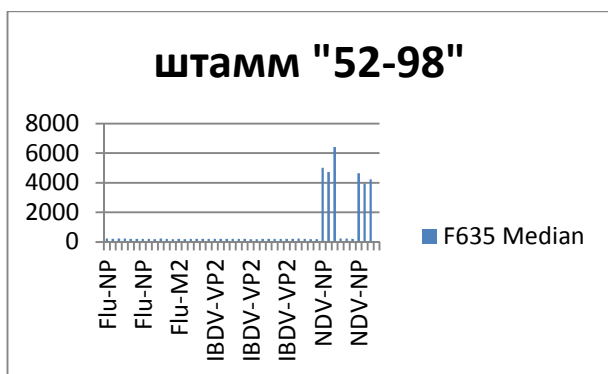
Грипп птиц		Инфекционный бурсит кур		Болезнь Ньюкасла		Инфекционный бронхит птиц	
1		2		3		4	
Flu-NP	13806,5	Flu-NP	238	Flu-NP	241	Flu-NP	215
	15009		213,5		222		201
	14720		199		232		189
BUF	209	BUF	216,5	BUF	242	BUF	185
	224		224,5		215		185
	209		199		216		197
Flu-NP	13531	Flu-NP	205,5	Flu-NP	210	Flu-NP	215
	15193		208		204		221
	14288		212		201,5		198
Flu-M2	21376	Flu-M2	207	Flu-M2	237	Flu-M2	267
	21546		215		207		215
	24148		199		200,5		228
Flu-M2	15962	Flu-M2	198	Flu-M2	219	Flu-M2	225
	17802		216		196		219
1	2	3	4	5	6	7	8
	16306		212		208		221,5
Flu-M2	18188	Flu-M2	208,5	Flu-M2	216,5	Flu-M2	222
	17411,5		214		216		216
	16636,5		213		214		205
IBDV-VP2	296	IBDV-VP2	1227,5	IBDV-VP2	222	IBDV-VP2	191
	370		1376		221		175

	357		1380		223		204
IBV-S1	207	IBV-S1	299,5	IBV-S1	207	IBV-S1	65535
	205		302		221		65535
	204		292		213		65535
IBDV-VP2	318	IBDV-VP2	1004	IBDV-VP2	192	IBDV-VP2	215
	294		1095		193		180
	310,5		1051		210		189
IBV-S1	214	IBV-S1	409,5	IBV-S1	209	IBV-S1	65535
	203		389		217		65535
	203		365		217		65535
IBDV-VP2	270	IBDV-VP2	714	IBDV-VP2	219	IBDV-VP2	196
	294		717		214		203
	247		703		225		221,5
IBV-S1	228	IBV-S1	407	IBV-S1	220	IBV-S1	65535
	242,5		481		185		65535
	233		480		201		65535
NDV-NP	199	NDV-NP	235	NDV-NP	5017,5	NDV-NP	204
	191		232		4739		195
	207		220,5		6425,5		200
BUF	225	BUF	242	BUF	227	BUF	191
	216		209		235,5		205
	235		214		207		186
NDV-NP	194	NDV-NP	217	NDV-NP	4655	NDV-NP	179,5
	201		223		3955		192
	200		220		4235		198

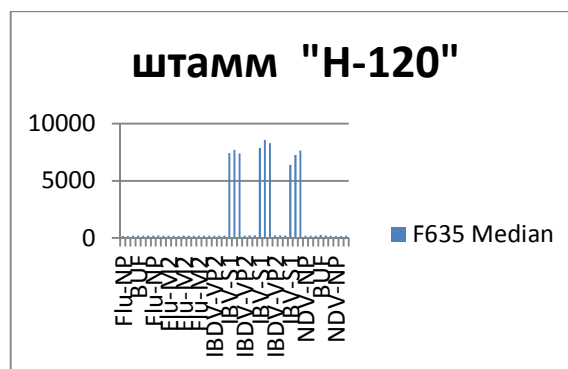
В качестве результативных данных использовали медианные значения флуоресценции трех точек, соответствующих определенному зонду, исключая величину флуоресценции фона, выраженные в относительных единицах (ед.). Медианные значения флуоресценции трех точек для гена NP вируса гриппа птиц составил: 13531 ед., 15193 ед., 14288 ед.; для М гена ВГА: 15962 ед., 17802 ед., 16306 ед.; для VP2 гена вируса инфекционного бурсита кур: 1227,5 ед., 1376 ед., 1380 ед.; для S1 гена вируса инфекционного бронхита птиц: 65535 ед., 65535 ед., 65535 ед.; для NP гена вируса БН: 5017,5 ед., 4739 ед., 6425,5 ед. Программа Marix ver. 5.5.0, адаптированная под разрабатываемый микрочип для выявления ВГА, БН, ИБК, ИБП позволяет автоматически анализировать данные, по-

лучаемые после обработки изображения флуоресценции точек на микрочипе, и выдавать однозначный ответ в формате "да/нет" с учетом пороговых значений. Анализируемый образец относили к определенному вирусу, если величина интенсивности флуоресценции зонда была сравнима с флуоресценцией положительных контролей М и NP гены ВГА, VP2 ген вируса ИБК, S1 ген вируса ИБП, NP ген ВБН.

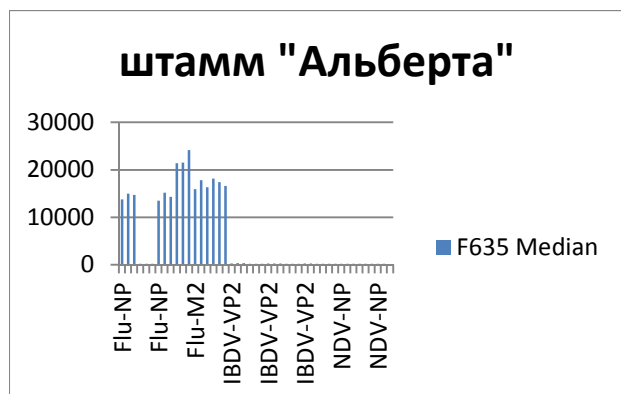
По результатам сканирования микрочипов определяли величину интенсивности флуоресценции зондов и строили гистограммы. Используя количественные данные, для каждой анализируемой пробы строились диаграммы, по значениям которых определяли положительно сработавшие зонды для исследуемых вирусных инфекций. В результате анализа построены диаграммы, которые представлены на рисунках 1.



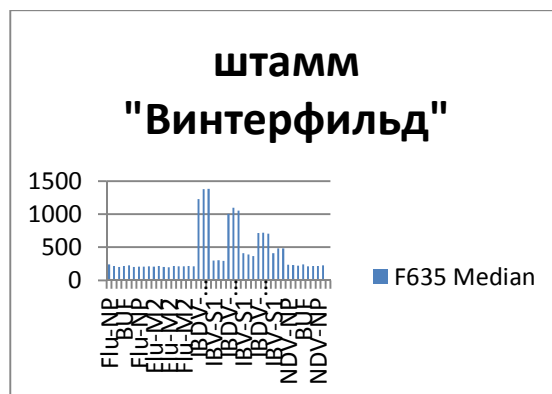
1



2



3



4

Рис. 1. 1 – диаграмма гибридизации кДНК штаммов вируса БН на микрочипе; 2 – диаграмма гибридизации меченых кДНК штаммов ИБП на микрочипе; 3 – диаграмма гибридизации меченых кДНК штаммов ВГА на микрочипе; 4 – диаграмма гибридизации меченых кДНК штаммов ИБК на микрочипе.

Из полученных диаграмм видно, что все исследуемые кДНК вирусных штаммов связались специфично с соответствующими зондами на микрочипе.

Использование микрочипов улучшает качество и сокращает продолжительность анализа при молекулярной диагностике инфекционных заболеваний, поэтому используется как независимый метод скрининга для детекции специфических генов одновременно нескольких болезней в исследуемых образцах [5-7]

Таким образом, при исследовании анализированных материалов специфической флуоресценции значительно превышало значение фоновой ($P < 0,05$). Кроме того, во всех образцах достоверно детектированы М и NP гены вируса гриппа птиц, VP2 ген вируса инфекционного бурсита кур, S1 ген вируса инфекционного бронхита птиц, NP ген болезни Ньюкасла.

Литература:

1. Маркелов М.Л., Шипулин Г.А., Покровский В.И. Технологии биочипов – новые возможности в диагностике болезней человека // Терапевтический архив. - 2008. - №4. - С.79-85.

2. Dorris D.R., Ramakrishnan R., Trakas D., Dudzik F., Belval R. A highly reproducible, linear, and automated sample preparation method for DNA microarrays // Genome Res. – 2002. - Vol.12. - P.976-984.

3. Debouck C., Goodfellow P.N. DNA microarrays in drug discovery and development // Nat Genet. - 1999. - Vol.21. - P. 48-50.

4. Auburn R.P., Kreil D.P. Robotic spotting of cDNA and oligonucleotide microarrays // Trends in Biotechnology. – 2005 - Vol. 7. - P. 374-379.

5. Sultankulova K.T., Chervyakova O.V., Kozhabergenov N.S., Shoraeva K.A., Stochkov V.M., Orynbaev M.B., Sandybaev N.T., Sansyzybay A.R. and Vasin A.V. Comparative Evaluation of Effectiveness of IAVchip DNA Microarray in Influenza A Diagnosis // Sci World J. – 2014

6. Lu-Yuan L., He-Yi Y., Tsang-Hai C., Tsung-Chi C. Development of a microarray for simultaneous detection and differentiation of different tospoviruses that are serologically related to Tomato spotted wilt virus // Virol J. -2017; 14:1.

7. Wang L.C., Pan C.H., Severinghaus L.L., Liu L.Y., Chen C.T., Pu C.E., Huang D., Lir J.T., Chin S.C., Cheng M.C., Lee S.H., Wang C.H. Simultaneous detection and differentiation of Newcastle disease and avian influenza using oligonucleotide microarrays // Vet Microbiol. – 2008; – Vol. 27: – P 217–226.

Рецензент: к.вет.н., профессор Орынбаев М.Б.