

## КОНСТРУИРОВАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ pJET1.2/BLUNT/ADHEX В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

*Штыров А. А., Сивец Н. В.,*

*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, Республика Беларусь*

### **Аннотация**

Рассматривается способ интегрирования ампликонов по тупым концам в плазмидный вектор pJET1.2/blunt. Выполняется сравнительный анализ чувствительности использования рекомбинантной плазмиды pJET1.2/blunt/AdHex и нативной ДНК аденовируса при постановке разных вариантов ПЦР  $5 \times 10^2$  копий/мл и  $5 \times 10$  ГЭ/мл соответственно. Показывается, что использование рекомбинантной плазмиды в качестве положительного контроля для диагностических тест-систем повышает воспроизводимость результатов.

**Ключевые слова:** эпидемиологический надзор, метод флуоресцирующих антител рекомбинантная плазида, диагностические тест-системы, скрининг, аденовирус человека, интегрированная вставка, участок гена, гексон, метод полимеразной цепной реакции.

### **Введение**

В эпидемиологическом надзоре за вирусами, вызывающими острые респираторные заболевания (ОРВИ), используют серологические методы, например, метод флуоресцирующих антител (МФА). Среди всего разнообразия ОРВИ возбудителей (их более 200) аденовирусы человека являются с частотой от 7,6 % до 41,6 %. Поэтому аденовирусы занимают особое место как этиологический агент заболевания ОРВИ среди населения, особенно среди детей [1-3].

Метод МФА позволяет проводить массовый скрининг проб за короткое время [1]. Эффективность такого метода напрямую зависит от

аналитической чувствительности используемых антител, полученных при производстве, и подготовке анализируемого материала (назофарингеальный смыв) [3]. Кроме того, неправильный забор смыва может приводить к ложноотрицательным результатам. Для правильной интерпретации результата необходимо вводить контроль, который бы обеспечивал надежность результата. Методически постановка МФА не всегда обязывает введение контроля. Поэтому необходимым условием при выборе подходящего метода исследования назофарингеального смыва является его высокая чувствительность, специфичность и на-

дежность получаемых результатов. Указанным требованиям полностью соответствует метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Проведение любого типа ПЦР требует включения контрольных образцов для обеспечения наблюдения за отдельными этапами ее постановки, учета потерь и эффективности. Контрольные пробы вносятся в реакционную смесь отдельно от образца в другие пробирки. Амплификация таких пробирок проходит параллельно вместе с пробами. Основным назначением таких образцов является определение ложноотрицательных результатов, возникающих из-за ошибок экспериментатора, либо вследствие ингибирования амплификации (что встречается довольно часто при экстракции нуклеиновых кислот из сложных образцов, таких как кровь, соскобы эпителия, экскременты и т.п.) [4].

### **Исходные материалы и методы**

В качестве вектора для клонирования была использована многокопийная плаزمида pJET/blunt («Fermentase», Литва), в качестве носителя генетической контрукции – компетентные клетки авирулентного штамма *E.coli* DH5α («Promega», США). Трансформацию компетентных клеток осуществляли с использованием хлористого кальция. Выделение плазмид осуществляли набором Gene JET Plasmid Miniprep Kit («Fermentase», Литва).

Для постановки полимеразной цепной реакции применяли генно-инженерную Taq-полимеразу («Fermentase», Литва). Реакции проводили в амплификаторе MJ mini ("Bio-

Важной задачей при проведении ПЦР является получение надёжного и безопасного положительного контроля. Одним из возможных путей решения данной задачи является использование в качестве положительного контроля рекомбинантной плазмидной ДНК. Такой контроль безопасен и недорог при приготовлении, устойчив при хранении и применении, легко стандартизируется.

Поэтому целями статьи является:

- изложение полученных результатов по созданию рекомбинантной плазмиды с интегрированной вставкой участка гена гексона аденовируса человека;
- оценка возможности применения рекомбинантной плазмиды в качестве положительного контроля в диагностических тест-системах для выявления аденовируса человека методом ПЦР.

Rad, США") с праймерами к участку гена гексона [5, 6]. В работе использовали штамм аденовируса человека 3 серотипа из коллекции ГУ РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе Rotor-Gene ("Corbet Research", Австралия) с использованием диагностических праймеров на участке гена гексона аденовируса человека [6]. Визуализацию ПЦР ампликонов и плазмид проводили методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле с окраской бромистым этидием.

Первичную нуклеотидную последовательность рекомбинантных плазмид определяли с использова-

нием автоматического секвинатора ABIPrism 3100SX («Applied Biosystem», США). Для расчета праймеров и анализа нуклеотидных последовательностей в работе использовали прикладные компьютерные программы OLIGO 6.65 ("Molecular Biology Insight", США) и BioEdit 7.0.5.3.

(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit>).

В работе применялись общепринятые методы культивирования бактерий, выделения плазмид, а также ряд других молекулярно-биологических методов (например, лигирование, трансформация, получение клонов *E.coli*, пересадение нуклеиновых кислот) [7].

**Результаты исследований.** На первом этапе работы был накоплен и

очищен ПЦР-продукт участка гена гексона размером 131 п.о. Лигирование ПЦР-продукта с вектором проводили *in vitro* по тупым концам в область полилинкера плазмиды pJET1.2/blunt, при этом количественное соотношение «вектор – вставка» было принято 3:1 (см. рисунок 1).

**Примечание.** Принятые обозначения генов: *rep* (pMB1) – репликон из плазмиды pMB1, ответственный за репликацию pJET1.2; *bla*(ApR) – ген β-лактамазы; *eco471R* – летальный ген; *P<sub>lacUV5</sub>* – модифицированный *P<sub>lac</sub>* промотер для экспрессии *eco471R* гена; *P<sub>T7</sub>* – промотер бактериофага T7 РНК полимеразы.

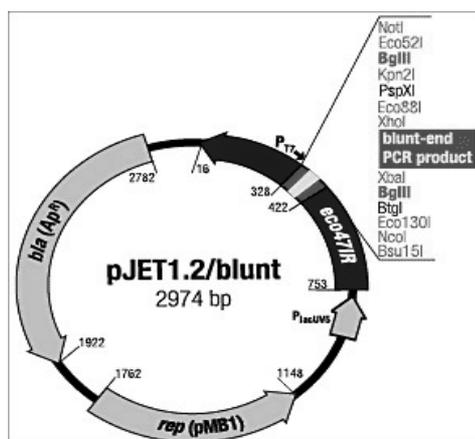


Рисунок 1 – Схематическая карта плазмиды pJET1.2/blunt

Основными особенностями указанного выше вектора является наличие двух генов, позволяющих проводить селекцию бактериальных колоний со встроенной плазмидой:

- ген β-лактамазы (*bla*(ApR)), придающий устойчивость к ампицилину;

- летальный ген *eco471R*, находящийся под контролем *P<sub>lacUV5</sub>* промотера.

Кроме того, плаزمида содержит полилинкер с большим количеством сайтов, удобных для клонирования, а также сайт для клонирования по тупым концам. Плазмида, получаемая после лигирования, устойчива

во всех лабораторных штаммах *E.coli*.

Гибридной плазмидой (pJET1.2/blunt/AdHex) в составе лигазной смеси, была проведена трансформация компетентных клеток *E.coli* штамм DH5 $\alpha$ . После трансформации клетки высевали на чашки Петри с плотным LB агаром, содержащим ампициллин в концентрации 50 мкг/мл. Через сутки выросшие колонии отбирали и культивировали в жидкой питательной LB среде. Для анализа рекомбинантных клонов с целью подтверждения встраивания необходимого фрагмента в клонирующий вектор, осуществляли выделение и очистку плазмидной ДНК, а также последующую постановку разовой амплификации полученных рекомбинантных плазмид с праймерами к гену гексона аденовируса. Все клоны плазмид содержали целевой ген.

Полученные плазмиды секвенировали с использованием праймеров на последовательности в области промотора P<sub>T7</sub> и летального гена *hex471R*. Первичные последовательности анализировали на наличие и определение нуклеотидных замен в гене и ориентацию вставки гена в

плазмиде. Для дальнейшей работы был отобран клон плазмиды pJET1.2/blunt/AdHex3, имеющий прямую ориентацию вставки и содержащий только одну нуклеотидную замену вне области отжига праймеров.

Для анализа возможности использования рекомбинантной плазмиды, как положительного контроля в тест-системе с целью выявления ДНК аденовируса человека методом ПЦР, использовали в качестве матрицы отобранный клон плазмиды pJET1.2/blunt/AdHex3. Ранее исследованная аналитическая чувствительность метода ПЦР с разведениями лабораторного штамма аденовируса 3 серотипа (титр исходного препарата 3,5 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл, что эквивалентно 5 $\times$ 10<sup>7</sup> ГЭ/мл) показала выявление вируса с содержанием 5 $\times$ 10<sup>3</sup> ГЭ/мл или 5 $\times$ 10<sup>2</sup> ГЭ/реакцию (см. рисунок 2). На рисунке приняты следующие обозначения: 1 — Маркер ДНК (GeneRuler100bp Plus "Fermentase"); 2 — 5 $\times$ 10<sup>7</sup> ГЭ/мл; 3 — 5 $\times$ 10<sup>6</sup> ГЭ/мл; 4 — 5 $\times$ 10<sup>5</sup> ГЭ/мл; 5 — 5 $\times$ 10<sup>4</sup> ГЭ/мл; 6 — 5 $\times$ 10<sup>3</sup> ГЭ/мл; 7 — 5 $\times$ 10<sup>2</sup> ГЭ/мл; 8 — 50 ГЭ/мл; 9 — 5 ГЭ/мл.

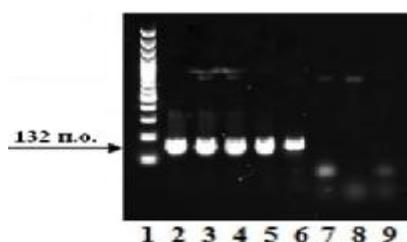


Рисунок 2 – Электрофореграмма результатов проверки аналитической чувствительности ПЦР с использованием в качестве матрицы аденовируса человека 3 серотипа

При использовании в качестве матрицы рекомбинантной плазмиды (начальная концентрация  $0,63 \text{ нг/мкл}$ , что эквивалентно  $5 \times 10^7$  копий/мл), искомый амплифицированный фрагмент выявляли в разведении  $1:10^6$  (чувствительность при этом составляет  $5 \times 10^2$  копий/мл или 50 копий/реакцию) (см. рисунок 3). На рисунке приняты обозначения: 1 — Маркер ДНК (GeneRuler100bp Plus "Fermentase"); 2 —  $5 \times 10^7$  копий/мл; 3 —  $5 \times 10^6$  копий/мл; 4 —  $5 \times 10^5$  копий/мл; 5 —  $5 \times 10^4$  копий/мл; 6 —  $5 \times 10^3$  копий/мл; 7 —  $5 \times 10^2$  копий/мл; 8 — 50 копий/мл; 9 — 5 копий/мл

Далее была исследована аналитическая чувствительность ранее описанной системы для детекции ДНК методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с разработанными ранее праймерами. Чувствительность данной системы с разведениями лабораторного штамма аденовируса 3 серотипа составляет 500 ГЭ/мл.

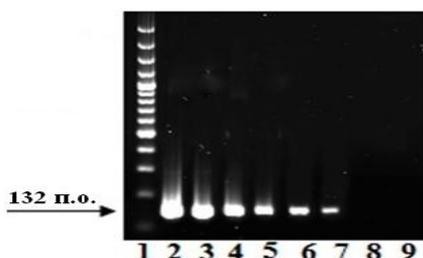


Рисунок 3 – Электрофореграмма результатов проверки аналитической чувствительности ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды pJET1.2/blunt/AdHex

При использовании в качестве матрицы рекомбинантной плазмиды, положительный результат достигался в разведении с содержанием  $5 \times 10^2$  копий/мл или 50 копий/реакцию. Причем, значение  $C_t$  (величина порогового цикла) для всех разведений находилась в пределах 18,6-36,9 (см. рисунок 4).

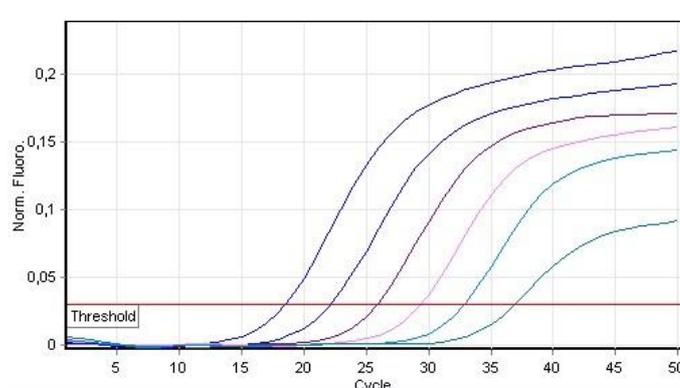


Рисунок 4 – Результаты ПЦР в режиме реального времени на участок гена гексона с разведениями рекомбинантной плазмиды pJET1.2/blunt/AdHex  $5 \times 10^7$  копий/мл – 5 копий/мл

Высокая чувствительность данных ПЦР-систем позволяет использовать в качестве положительного контроля минимальное количество плазмиды, что значительно удешевляет себестоимость такого набора.

Многочисленные циклы замораживания-оттаивания ДНК аденовируса при использовании её в качестве положительного контроля в ПЦР, приводили к деградации молекул ДНК. Аналогичные циклы, проводимые с плазмидой, напротив, не привели к потере её активности, что является одним из преимуществ применения её в качестве положительного контроля. Таким образом, полученный плазмидный вектор имеет небольшой размер, устойчив при хранении, приготовление его безопасно (исключена работа с ви-

русным агентом), может с успехом применяться как положительный контроль при проведении диагностических исследований.

**Заключение.** Основным результатом работы является получение рекомбинантной плазмиды pJET1.2/blunt/AdHex со вставкой участка гена гексона аденовируса. При этом проведена оценка нуклеотидных замен и ориентация вставки гена в плазмиде. Показано, что только один клон плазмиды pJET1.2/blunt/AdHex3 имеет прямую ориентацию вставки и содержит только одну нуклеотидную замену вне области отжига праймеров. Аналитическая чувствительность при использовании её в ПЦР составляет  $5 \times 10^2$  копий/мл или 50 копий/реакцию.

### Список литературы

1. Орлова, С.В. Этиологическая структура заболеваемости острыми респираторными инфекциями у госпитализированных детей / С.В. Орлова, Н.Л. Ключко, Е.В. Бобич и др. // *Здравоохранение*. – 2009. – № 12. – С. 14–16.
2. Сивец, Н.В. Эпидемиологические аспекты бокавирусной инфекции в Республике Беларусь / Н.В. Сивец, Н.В. Грибкова // *Сборник науч. трудов «Современные проблемы инфекционной патологии человека»*, Минск 2013 г. – С. 97–99.
3. Орлова, С.В. Информативность различных методов лабораторной диагностики аденовирусной инфекции / С.В. Орлова, А.А. Штыров, Г.Ф. Рудько, Е.И. Бореко // *Здравоохранение*. – 2010. – № 12. – С. 47–51.
4. Ребриков, Д.В. ПЦР «в реальном времени» / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов и др.; под. ред. д.б.н. Д.В. Ребрикова; 2-е изд., испр. и доп. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
5. Metzgar D. PCR analysis of Egyptian respiratory adenovirus isolates, including identification of species, serotypes and coinfections / Metzgar D. and et. all. // *J. Clin.* – 2005. – Vol. 43. – p. 5743–5752.
6. Штыров, А.А. Оптимизация проведения полимеразной цепной реакции для детекции аденовирусов / А.А. Штыров, С.В. Орлова // *Здравоохранение*. – 2010. – № 12. – С. 44–47

7. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrooks, S. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. –N.Y.: Cold Spring Harbor, – 2006. – 800 p.

### **Түйін**

pJET1.2/blunt плазмидті векторлардағы доғал ұштарының ампликонды интегралдау әдісі қарастырылады. Түрлі параметрлерді орнатуда мл ПТР  $5 \times 10^2$  дана / және  $5 \times 10$  ЕТ / мл сәйкес, тұқымдық ДНК аденовирустарының және рекомбинантты pJET1.2/blunt/AdHex плазмидтарының сезімталдығының салыстырмалы талдауы жүргізіледі. Рекомбинантты плазмидтерді бақылаушы ретінде қолдану диагностикалық тест-жүйелері өнімділік нәтижелерін арттырады.

### **Summary**

The method of integration of amplicon is examined on dull ends in a plasmid vector pJET1.2/blunt. The comparative analysis of sensitiveness of the use of recombinant plasmid pJET1.2/blunt/AdHex and native DNA of adenovirus is executed at raising of different variants of ПЦР of  $5 \times 10^2$  copies/of ml and  $5 \times 10$  ГЭ/of ml accordingly. Shown, that using of recombinant plasmid as positive control for diagnostic test-systems promotes the producibility of results.