

Zastosowanie sondy molekularnej do wykrywania wirusa pryszczycy

GRAŻYNA PAPROCKA, ANDRZEJ KĘSY

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Paprocka G., Kęsy A.

Application of molecular probes for detecting foot-and-mouth disease virus

Summary

The aim of these studies was to prepare the digoxigenin (DIG)-labeled molecular probes for the identification of RT-PCR products. FMDV infectious biological material from the laboratory collection was used. The PCR reaction of cDNA of all FMDV samples was performed using 30 cycles. The specificity of amplicons was confirmed by Southern Blot hybridization using DIG-labeled probes. By the use of DIG for the labeling of FMDV cDNA it was possible to obtain very specific and sensitive molecular probes. The hybridization method allowed us to verify RT-PCR results and can be applied as an additional diagnostic method for FMD.

Keywords: molecular probe, foot-and-mouth disease virus (FMDV), diagnostics

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że do wykrywania wirusa pryszczycy (foot-and-mouth disease virus – FMDV) znajduje zastosowanie metoda odwrotnej transkrypcji PCR (RT-PCR) stanowiąc uzupełnienie klasycznych testów, izolacji i ELISA. Autorzy podkreślają jej wysoką czułość, specyficzność, przydatność do wykrywania FMDV zarówno w próbkach pobranych zbyt późno od momentu pojawienia się objawów klinicznych jak również przechowywanych przez wiele lat i poddawanych wielokrotnemu odmrażaniu i zamrażaniu lub których warunki transportu były nieprawidłowe co mogło spowodować inaktywację właściwości zakaźnych oraz obniżenie koncentracji wirusa (2, 9, 11-16). RT-PCR jest etapem wstępnym mającym na celu powielenie kwasów nukleinowych. Właściwa detekcja materiału genetycznego wirusa w badanej próbce może być dokonana najprościej i najszybciej na drodze elektroforezy uzyskanych produktów reakcji, widocznych jako prążki w żelu agarozowym. Specyficzność reakcji warunkują startery, komplementarne do amplifikacji sekwencji. Otrzymanie produktów o wielkości spodziewanej dla danej pary starterów nie jest wystarczającym dowodem na prawidłowy przebieg amplifikacji (3). Ich identyfikację można potwierdzić metodą hybrydyzacji stosując sondy nieradioaktywne lub radioaktywne rutynowo używane w biologii molekularnej. Kinetyka i warunki hybrydyzacji z użyciem wymienionych sond nie różnią się istotnie. Należy jednak dodać, że nieradioaktywne sposoby znakowania i wykrywania kwasów nukleinowych eliminują zagrożenie dla zdrowia związane z ekspozycją na szkodliwe promieniowanie β o wysokiej energii, emitowane przez izotopy [^{32}P] [^{35}S], skracają czas

badania i zmniejszają jego koszty. Ponadto sondy znakowane nieradioaktywne okazały się bardziej stabilne. Aktualnie najczęściej używane do znakowania kwasów nukleinowych są pochodne digoksygeniny (DIG), które łatwo wykrywa się przy zastosowaniu specyficznych przeciwciał (IgG) o wysokim powinowactwie. Do transferu stosuje się filtry nitrocelulozowe lub nylonowe proste w użyciu i trwałe, silnie wiążące kwasy nukleinowe, o wysokiej czułości detekcyjnej (4, 5, 7, 8).

Celem badań było przygotowanie sondy molekularnej znakowanej digoksygeniną oraz jej zastosowanie do potwierdzenia specyficzności produktów RT-PCR.

Materiał i metody

Do badań użyto nabłonki pęcherzy pryszczycowych lub zakażone hodowle komórek z kolekcji Zakładu. Ich wykaz przedstawiono w poprzedniej pracy (13).

Izolacja RNA, reakcja odwrotnej transkrypcji oraz amplifikacja cDNA zostały wykonane wg wcześniej opisanych metod (13).

Startery. Zastosowano zestawy starterów P1 i P2 oraz P3 i P4. Ich sekwencje i lokalizację podano w tab. 1.

Elektroforeza produktów RT-PCR. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym i wybarwiano w roztworze bromu etydyny o stężeniu 0,5-1,0 $\mu\text{M}/\text{ml}$. Elektroforezę prowadzono przez 40 minut w buforze TBE (90 mM Tris-base, 90 mM kwas borny, 2 mM EDTA) przy stałym natężeniu prądu elektrycznego 100 mA. Jako wzorca długości łańcucha nukleotydowego używano G316A (Promega). Rozdziały elektroforetyczne analizowano oraz dokumentowano przy pomocy automatycznego systemu – Imagistore 5000 (Ultra Violet Products Ltd, Cambridge, UK). Wynik RT-PCR uznawano za do-

Tab. 1. Sekwencje i lokalizacja starterów wykorzystanych w badaniach

Pary starterów	Sekwencje 5' → 3'	Region genomu	Długość produktu RT-PCR
P1(n)	GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC	2A/2B	672 pz
P2(s)	GCGGATCCTGTCCACCACCACC	1D	
P3(n)	GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC	2A/2B	216 pz
P4(s)	CCTACCTCCTTCAACTACGG	1D	

Objaśnienia: n – starter nonsensowny, s – starter sensowny

datni, jeżeli w świetle UV transiluminatora były widoczne prążki o wielkości spodziewanej dla danej pary starterów.

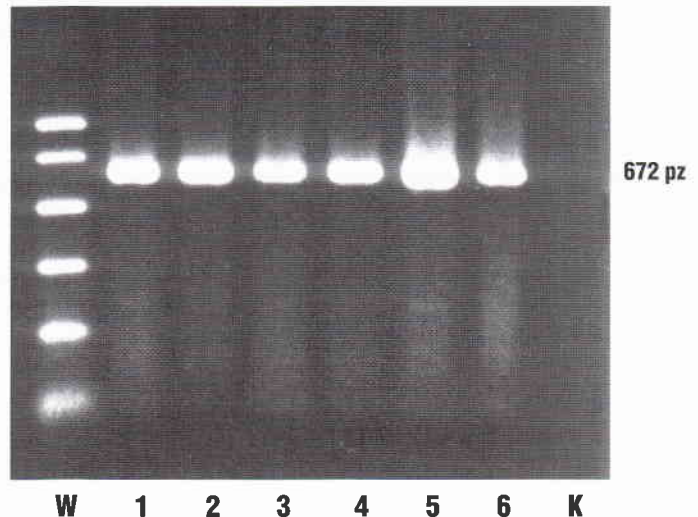
Hybrydyzacja. Żel po wybarwieniu w roztworze bromku etydyliny denaturowano przez 60 min. w roztworze zawierającym 5M NaCl i 5 M NaOH, przemywano wodą destylowaną i inkubowano w buforze neutralizującym (5 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 7,6) na wytrząsarce 60 min. w temp. pokojowej. Następnie żel umieszczano w naczyniu, w którym zachodził proces przenoszenia cDNA na filtr (Hybond™ – NAmersham). Na kilka warstw ligniny nakładano dwa, wielkości żelu arkusze bibuły Whatman 3MM, zwilżone roztworem 5×SSC (20×SSC – 3M NaCl, 0,3 M cytrynian sodu pH 7,0). Na bibuły układano zwilżony filtr, na nim oznaczony przez ścięcie narożnika żel w takiej samej orientacji w jakiej prowadzono elektroforezę, przykrywano dwoma bibułami 3 MM z 5×SSC i zabezpieczano przed wyschnięciem parafilmem. Całość równomiernie obciążano. Po zakończeniu transferu filtr oznaczano w tym samym rogu co żel i suszono na bibule Whatman 3 MM. cDNA immobilizowano na filtrze naświetlając lampą UV przez 3 minuty, a następnie prehybrydyzowano w roztworze o składzie: 50% formamid, 5×SSC, 0,1%-N-laurylosarcosine, 0,2% SDS i 2% roztwór blokujący (Boehringer). Proces prehybrydyzacji trwał 2 godziny w temp. 42°C. Po jego upływie dodawano uprzednio zdenaturowaną sondę. Sondę molekularną stanowił fragment cDNA FMDV scrotypu O z regionu 2A/2B/1D wielkości 216 pz, powielony z użyciem starterów P3 i P4 (tab. 1), a następnie oczyszczony przy pomocy QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Sondę znakowano przy użyciu PCR DIG Probe Synthesis Kit (Boehringer), wg instrukcji podanej przez producenta. Hybrydyzację prowadzono w temp. 42°C przez 18 godz. Po jej zakończeniu, w celu pozbycia się resztek nie związanej sondy, filtr płukano przez 30 min. w roztworach o składzie: 1) 2×SSC, 0,1% SDS w temp. pokojowej; 2) 0,1×SSC, 0,1% SDS w temp. 42°C. Kolejnym etapem było płukanie filtru przez 1 min. w buforze zawierającym 0,1 M kwas maleinowy, 0,15 M NaCl pH 7,5 z dodatkiem 0,3% Tween 20, a następnie inkubowanie przez 30 min. w 0,1% roztworze blokującym przygotowanym na buforze opisanym powyżej. Po tym czasie filtr umieszczano w roztworze koniugatu (Boehringer) i inkubowano przez 30 min., po czym płukano 30 min. w buforze zawierającym kwas maleinowy oraz inkubowanie 2 min. w buforze o składzie 1 M Tris-HCl pH 9,5, 5 M NaCl, 1 M MgCl₂. W celu uwidocznienia reakcji filtr zanurzano w roztworze substratu

BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolilo fosforan/chlorek nitrobenzotetrazolu) (Boehringer).

Wyniki i omówienie

Amplifikację wszystkich badanych próbek cDNA FMDV uzyskano podczas 30 cykli reakcji PCR. Elektroforezę produktów RT-PCR wykonywano w 1,5% żelu agarozowym wobec wzorca długości łańcucha nukleotydowego. Żel wybarwiano w bromku etydyliny i analizowano w świetle UV.

Analiza wykazała obecność prążków wielkości 672 pz. Kontrolę stanowił nie zakażony nabłonek – wynik ujemny (ryc. 1). Specyficzność otrzymanych

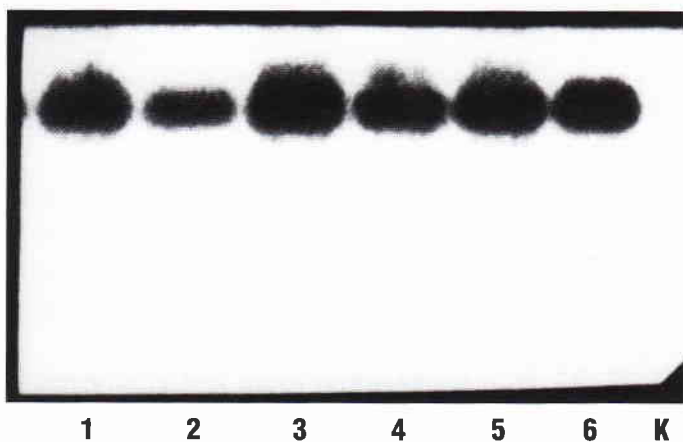


Ryc. 1. Elektroforetyczny rozdziel produktów amplifikacji cDNA uzyskanych przy użyciu pary starterów P1+P2. Ścieżki 1-6 odpowiadają kolejnym badanim próbkom. W – wzorec G316A (Promega). K – kontrola ujemna: nie zakażony nabłonek.

amplikonów potwierdzono poprzez hybrydyzację Southerna przy użyciu sondy znakowanej digoksygeniną (DIG). Popularność nieradioaktywnego systemu znakowania kwasów nukleinowych pochodną digoksygeniny związana jest przede wszystkim z bezpieczeństwem detekcji, krótkim czasem uzyskiwania wyników oraz ich dokładnością i powtarzalnością. Digoksygenina jest sterydowym haptenem, chemicznie uzyskiwanym z lanatozydu C i aglikonu digoksyny, w warunkach naturalnych występujących w naparstnicy. Pochodne digoksygeniny zostały wykorzystane do znakowania DNA, RNA i oligonukleotydów. DIG doskonale nadaje się do tego celu, gdyż nie występuje w komórkach zwierzęcych, w przeciwieństwie do biotyny, zastosowanej w pierwszej nieradioaktywnej metodzie detekcji kwasów nukleinowych. Dodatkowymi właściwościami digoksygeniny jest również łatwość łączenia z nukleotydami, dostępność przeciwciał anti-DIG o wysokim powinowactwie oraz fakt, że jej rozmiar i hydrofilność umożliwiają wbudowanie znakowanych nukleotydów do kwasów nukleinowych (4, 5, 6, 7). Wymienione zalety zadecydowały że wykorzystano ją w niniejszych badaniach, na które składały się trzy etapy: 1 – znakowanie sondy kwasu nukleino-

wego digoksygeniną, 2 – hybrydyzacja wyznakowanej sondy do fragmentu kwasu nukleinowego na filtrze, 3 – detekcja za pomocą przeciwciał anti-DIG połączonych bezpośrednio z fosfatazą alkaliczną. Enzym ten wykazuje wysoki stopień termostabilności i oporności na warunki środowiskowe, co sprawia, że jest preferowany w wykrywaniu kwasów nukleinowych (1). Substratem dla fosfatazy alkalicznej był BCIP/NBT. BCIP i NBT tworzą bezbarwny lub lekko żółty rozpuszczalny kompleks substratu. Po defosforylacji przez alkaliczną fosfatazę zachodzi reakcja redoks, w wyniku której powstaje niebiesko-purpurowy, nierozpuszczalny osad w miejscu, gdzie enzym jest aktywny. Umożliwia to czułą detekcję kwasów nukleinowych znakowanych DIG przez fosfatazę alkaliczną sprzężoną z przeciwciałem anti-DIG na filarach. Reakcja barwna pojawiała się po około 20 minutach.

Łączenie się sondy z docelowym fragmentem kwasu nukleinowego wg komplementarności zasad powodowało powstawanie hybrydów ze wszystkimi badanymi produktami RT-PCR i świadczyło o ich specyficzności (ryc. 2). Meyer i wsp. (10) stwierdzili, że metodą RT-PCR oraz analizą produktów reakcji w żelu możliwe jest wykrycie 10 TCID₅₀ natomiast przy użyciu hybrydyzacji 0,1 TCID₅₀.



Ryc. 2. Wykrywanie produktów amplifikacji przedstawionych na ryc.1 po hybrydyzacji z sondą molekularną. Oznaczenia ścieżek identyczne z ryc. 1.

Na podstawie wyników badań można stwierdzić, że użycie DIG do znakowania cDNA FMDV umożliwia uzyskanie sondy specyficznej i odpowiednio czulej w sposób prosty i szybki. Metoda hybrydyzacji pozwala weryfikować uzyskiwane wyniki RT-PCR wzbogacając możliwości laboratoryjnego rozpoznawania pryszczycy.

Piśmiennictwo

- Bronstein I., Voyta J., Lazzari K., Murphy O., Edwards B., Kricka L.: Rapid and sensitive detection of DNA in Southern blots with chemiluminescence. *BioTechniques* 1990, 8, 314-319.
- Callens M., De Clercq K., Gruia M., Danes M.: Detection of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction and virus isolation in contact sheep without clinical signs of foot-and-mouth disease. *Vet. Quart.* 1998, 20 Suppl. 37-40.
- Hill C. S.: *Molecular Diagnostics for Infectious Diseases*, J. Clin. Ligand Assay 1996, 19, 43-52.
- Höltke H. J., Ankenbauer W., Muhlegger R., Rein R., Sagner G., Seibl R., Walter T.: The digoxigenine (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids. *Cell Mol. Biol.* 1995, 41, 883-905.
- Kessler C.: The digoxigenin (DIG) technology – a survey on the concept and realization of a novel bioanalytical indicator system. *Mol. Cell Probes.* 1991, 5, 161-205.
- Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. C.: Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 6633-6637.
- Lion T., Haas O. A.: Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 1990, 188, 335-337.
- Martin R., Hoover C., Grimme S., Grogan C., Höltke H. J., Kessler C. A.: Highly sensitive, nonradioactive DNA labeling and detection system. *Bio-Techniques* 1990, 6, 762-768.
- Marquardt O., Straub O. C., Ahl R., Haas B.: Detection of foot-and-mouth disease virus in nasal swabs of asymptomatic cattle by RT-PCR within 24 hours. *J. Virol. Methods* 1995, 53, 255-261.
- Meyer R. F., Brown C. C., House C., House J. A., Molitor T. W.: Rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus in tissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene. *J. Virol. Methods* 1991, 34, 161-172.
- Moss A., Haas B.: Comparison of the plaque test and reverse transcription nested PCR for the detection of FMDV in nasal swabs and probang samples. *J. Virol. Methods* 1999, 80, 59-67.
- Nunez J. I., Blanco E., Fernandez T., Dopazo J., Sobrino F.: RT-PCR in foot-and-mouth disease diagnosis. *Vet. Quart.* 1998, 20 Suppl. 2, 34-36.
- Paprocka G., Kęsy A.: Wykrywanie wirusa pryszczycy w materiale biologicznym. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 114-117.
- Reid S. M., Forsyth M. A., Hutchings G. H., Ferris N. P.: Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Methods* 1998, 70, 213-217.
- Reid S. M., Ferris N. P., Hutchings G. H., Samuel A. R., Knowles N. J.: Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 2000, 89, 167-176.
- Reid S. M., Ferris N. P., Hutchings G. H., De Clercq K., Newman B. J., Knowles N. J., Samuel A. R.: Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: use of phylogenetic data to evaluate primers for the typing of viral RNA in clinical samples. *Arch. Virol.* 2001, 146, 2421-2434.

Adres autora: doc. dr hab. Grażyna Paprocka, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola; e-mail: grazyna@piwzp.invar.net.pl

BOND R., CURTIS C. F., HENDRICKS A., FERGUSON E. A., LLOYD D. H.: Śródskórny test reaktywności na *Malassezia pachydermatis* u psów z atopią. (Intradermal test reactivity to *Malassezia pachydermatis* in atopic dogs). *Vet. Rec.* 150, 448-449, 2002 (14)

Coraz powszechniej panuje pogląd, że *Malassezia pachydermatis* jest przyczyną zapalenia uszu i skóry u psów. W badaniach określono częstotliwość występowania wyników dodatnich w śródskórnym teście alergicznym z użyciem *M. pachydermatis* u psów z atopią. Badaniem objęto 18 psów w wieku od 1 do 11 lat w południowo-zachodniej Anglii. U 11 psów zdiagnozowano uprzednio zapalenie ucha zewnętrzne wywołane przez *Malassezia*, a u 6 drobnoustroj ten wywoływał zapalenie ucha zewnętrznego i skóry. U 10 psów wykonano też testy alergiczne z 44 handlowymi alergenami (ARTU Biologicals), u 8 psów z 30 alergenami. U 17 psów wystąpił dodatni odczyn alergiczny przynajmniej na jeden alergen środowiskowy. Najczęściej dodatni odczyn występował na *Dermatophagoides farinae* (15 psów) *Acarus siro* (11 psów), *Tyrophagus* sp. (8 psów) i *Dermatophagoides pteronyssinus* (7 psów). Osiem psów reagowało dodatnio na alergen *M. pachydermatis* zastosowany w jednym lub w kilku rozcieńczeniach (stężenie białka 2, 20 i 200 µg/ml). Najsilniejsze odczyny występowały z alergenem zawierającym 200 µg/ml białka. Spośród 8 psów reagujących dodatnio na alergen *M. pachydermatis* u 7 występowało zapalenie ucha zewnętrznego lub zapalenie skóry wywołane przez ten drobnoustroj.