

Анализ вируса гепатита С с использованием ДНК-биочипов

Шопаева Г.А., *Пышная И.А., *Дмитриенко Е.В., *Зарытова В.Ф., *Пышный Д.В., Бейсембаева Ш.А. Казахский национальный медицинский университет им.С.Д.Асфендиярова, г.Алматы, Казахстан; *Институт химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ) СО РАН, г.Новосибирск, Россия
УДК 616.36-002-073:577.213/.217

ДНК-биочиптерін қолданған С гепатиті вирусын талдау С вирусі гепатитін дер кезінде анықтау басты мәселе қалында қалып отыр. Қазақстанда аурулардан табылған гепатит С вирусының түрлерін генотиптеу мақсатында, ДНК биочиптері негізіндегі жаңа тест—системаларды пайдалану көрсетілді. Тест-системасы ВГС генотипін анықтауда референс—тәсіліне сәйкес келеді. Түйінді сөздер: гепатит С вирусы, диагностика, ДНК-биочипі.

Analysis of C hepatitis virus by using DNA-biochips

The problem of early diagnostics of a viral hepatitis C keeps the urgency. The opportunity of use of new test-system on basis DNA-biochips for genotyping of HCV-samples allocated from patients in Kazakhstan is shown. The test-system corresponds to results of a referens-method (sequenation) at a definition of genotype of HCV. Key words: a virus of a hepatitis C, diagnostics, DNA-biochip.

Своевременная диагностика многих заболеваний до сих пор остается актуальной проблемой практической медицины. Проблема вирусных гепатитов, в силу их широкой распространенности, становится одной из наиболее значимых медицинских проблем во всем мире. В настоящее время на планете проживает более 200 млн. носителей вируса гепатита С (ВГС), примерно 1 млн. человек ежегодно погибает от патологий, так или иначе связанных с этими заболеваниями (700 тыс. - от цирроза печени и 300 тыс. - от первичного рака печени). Учитывая продолжающийся рост заболеваемости парентеральными вирусными гепатитами, проблема профилактики, диагностики и лечения вирусных гепатитов является одной из ведущих в инфекционной патологии.

Основным методом лабораторной диагностики вирусных гепатитов является иммуноферментный метод, выявляющий характерные для соответствующих вирусов маркеры. Однако высокая гетерогенность вирусов гепатита С и его слабая иммуногенность, циркуляция вируса в минимальных концентрациях не позволяют определять его в крови.

В то же время РНК-диагностика вирусов гепатита С, основанная на амплификации кДНК вируса, более чувствительна, позволяет выявлять инфекцию на ранних стадиях, контролировать эффективность лечения и прогнозировать течение инфекции. В ИХБФМ на основе технологии ДНК-диагностики нового поколения с использованием составных или «сшитых» тандемов трех коротких олигонуклеотидов, позволяющих достоверно отличать последовательности, содержащие одну нуклеотидную замену, создана тест-система как для выявления, так и для генотипирования вируса гепатита С (1).

Цель –

провести генотипирование вирусов гепатита С с использованием тест-системы на основе ДНК-биочипов.

Анализ вируса гепатита С с использованием ДНК-биочипов Проблема своевременной диагностики вирусного гепатита С сохраняет свою актуальность. Продемонстрирована возможность использования новой тест-системы на основе ДНК-биочипов для генотипирования образцов вируса гепатита С, выделенных от больных в Казахстане. Тест-система соответствует результатам референс-метода (секвенирование) при установлении генотипа ВГС.

Ключевые слова: вирус гепатита С, диагностика, ДНК-биочип.

Материалы и методы

Сотрудниками Казахского национального медицинского университета им. С.Д.Асфендиярова (г.Алматы, Казахстан) были получены ПЦР-образцы с использованием комплекта реагентов для генотипирования вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР (научно-производственная фирма «ДНК-технология») в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Количество ПЦР-образцов составило 58 штук. В качестве исходного материала была использована кровь пациентов туберкулезом легких с сопутствующим хроническим гепатитом С, проживающих на территории Казахстана.

Для проведения работ по анализу вируса гепатита С (ВГС) с использованием сконструированных сотрудниками ИХБФМ СО РАН ДНК-чипов были использованы ацетонитрил, калий фосфат, ацетон (ДиаМ, Москва), фосфорамидные синтоны (GlenResearch, США), Stains-all (Aldrich Chem Co, США); мочевины (Merck, Германия); акриламид, KCl, NaCl, MgCl₂ (ДиаМ, Москва); N,N'-метиленабисакриламид (Acros, США); капроновая мембрана («Хийу Калур», Эстония); трис-HCl, Tween-20, конъюгат стрептавидин щелочная фосфатаза (Sigma, США); хромогенные субстраты BSIP и NBT (Molecular Probes, США); dNTP, Taq полимеразы, dUTP-Bio (ИХБФМ СО РАН). Все использованные органические растворители были перегнаны над P₂O₅ и хранились над молекулярными ситами или гидридом кальция. Тест-система содержит пробирку с капроновым чипом, промывочные и буферные растворы, а также пробирки с ферментативными растворами.

Гибридизационный анализ проводили в 30 мкл буфера, содержащего 10 mM трис-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.5% Tween-20, 1.8 mM MgCl₂. В качестве матриц использовали синтезированные олигонуклеотиды (10⁻⁸ M) или разбавленную в 20 раз стандартную ПЦР-смесь. Реакцию проводили 30 минут при 62°C. Далее носитель при комнатной температуре отмывали 3 раза по 1 мл раствором: 0.5% Tween-20 в буфере, содержащем 20 mM трис-HCl, pH 7.5, 100

mM NaCl, 2 mM MgCl₂. К промытому носителю добавляли 20 мкл раствора, содержащего стрептавидин-щелочную фосфатазу в концентрации 1 мкг/мл, выдерживали при комнатной температуре в течение

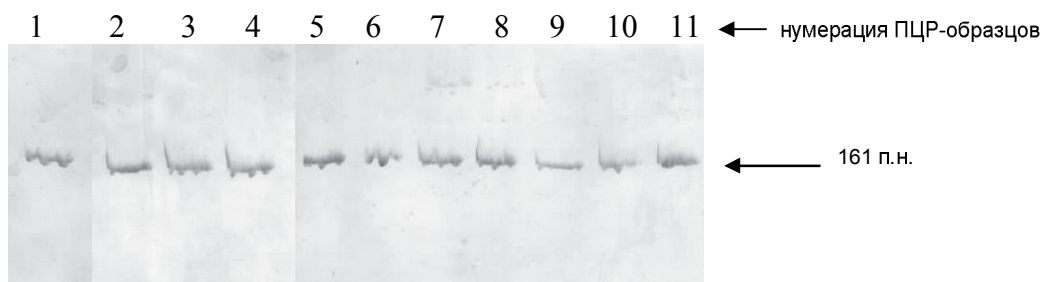


Рисунок 1. Сканированное изображение полиакриламидного геля после проведения гель электрофореза и окрашивания нуклеотидного материала Stain'all.

30 минут. Затем носитель отмывали последовательно: 4 раза по 500 мкл раствором 0.5% Tween-20 в буфере, содержащем 20 mM трис-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂; и 1 раз по 500 мкл раствором 0.1% Tween-20 в буфере, содержащем 20 mM трис-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂. Полностью отмытый капрон заливали 60 мкл раствора хромогенных субстратов: 0.5 мкл BSIP, 1.8 мкл NBT в 6 мкл 20 mM трис-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂. Визуализацию результата анализа проводили в течение 60 минут, фиксируя изменения окраски полимера сканированием, данные обрабатывали по интенсивности окрашивания пятен в шкале серых тонов с помощью программы "Gel-Pro Analyzer".

Для получения ДНК-чипов и разработки методики и условий анализа ВГС на сконструированных ДНК-чипах на модельных системах за основу фиксации олигонуклеотидных зондов на капрон нами был взят метод ультрафиолетовой иммобилизации олигонуклеотидов (2). Способ выявления продуктов ОТ-ПЦР 5'-нетранслируемого региона (5'-UTR) был предложен ранее (1).

Результат анализа может быть зафиксирован при помощи обычного офисного сканера после перенесения мембраны на плоскую поверхность. Отнесение результата анализа к определенному генотипу следует проводить после сравнения с шаблонами.

Тестирование анализируемых ПЦР-образцов с помощью метода секвенирования.

Для проведения секвенирования было отобрано 7 ПЦР-

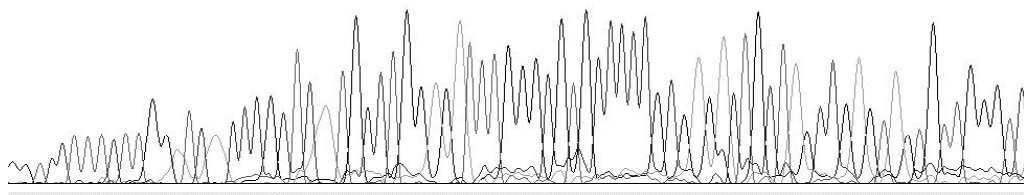
образцов (1, 2, 5, 7, 8, 9, 11 (рисунок 1)). К 20 мкл реамплифицированного ДНК-фрагмента добавляли 30 мкл H₂O (б/д), полученную смесь осаждали насыщенным раствором ацетата аммония, затем 96% EtOH. Осадок последовательно промывали 70% EtOH (200 мкл), 96% EtOH (200 мкл). Промытый осадок растворяли в 10 мкл H₂O (б/д), добавляли олигонуклеотидные праймеры (10⁻⁶ M), 5 мкл буфера для секвенирования, содержащего BD. Полученную реакционную смесь помещали в амплификатор. Амплификацию проводили в режиме: денатурация T=96°C 8 сек; отжиг T=64°C 4 мин - 2 цикла; денатурация T=96°C 8 сек; отжиг T=60°C 4 мин - 4 цикла; денатурация T=96°C 10 сек; отжиг T=50°C 5 сек, элонгация T=60°C 4 мин - 16 циклов. Затем проводили осаждение насыщенным раствором ацетата аммония, 96% EtOH. Осадок сушили при T=37°C. Секвенирование было проведено в Межинститутском Центре Секвенирования ДНК на автоматическом секвенаторе, ДНК- модель ABI310A (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Тестирование ПЦР фрагментов ДНК проводили с использованием 10% полиакриламидного геля (ПААГ), с помощью метода гель-электрофореза. По окончании электрофореза, ПААГ переносили на полиэтиленовую пленку, помещали в эмалированную емкость и обрабатывали в течение 15 минут коммерчески доступным реактивом Stain'all. Наличие нуклеотидного материала определяли по появлению окрашенных полос, соответствующих длине 161 п.н.. Результат тестирования нуклеотидного материала ПЦР-фрагментов проводили с использованием офисного

ПЦР-образец 1 по результатам секвенирования генотип 1b

NNN...GGTCCTTTCTGGATCAACCCGCTCATGCTGGAGATTGGGGCGTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTC...NNN

б б т с с т т т с т т т б г а т с а а с с с г с т с а а т г с с т б г а г а т т т г б б с с т г с с с с с г с г а г а с т г с т а г с с б а г т а г т г т т б б г т с



ПЦР-образец 2 по результатам секвенирования генотип 2a

NNN...GGTCCTTTCTGGATAAACCCACTCTATGCCCGCCATTGGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTT...NNN

ПЦР-образец 5 по результатам секвенирования генотип 3a

NNN...GGTCCTTTCTGGAGCAACCCGCTCATACCCAGAAATTTGGGGCGTGCCCCCGGAGATCACTAGCCGAGTAGTGTGGGTC...NNN

ПЦР-образец 7 по результатам секвенирования генотип 3a

NNN...GGTCCTTTCTGGAGCAACCCGCTCAATACCCAGAAATTTGGGGCGTGCCCCCGGAGATCACTAGCCGAGTAGTGTGGGTC...NNN

ПЦР-образец 8 по результатам секвенирования генотип 3a

NNN...GGTCCTTTCTGGAAACAACCCGCTCAATACCCAGAAATTTGGGGCGTGCCCCCGGAGATCACTAGCCGAGTAGTGTGGGTC...NNN

ПЦР-образец 11 по результатам секвенирования генотип 3b

NNN...GGTCCTTTCTGGAAACAACCCGCTCAATGCCAGAAATTTGGGGCGAGCCCCCGGAGATCACTAGCCGAGTAGTGTGGGTC...NNN

Рисунок 2. Нуклеотидная последовательность ПЦР-образцов 1, 2, 5, 7, 8, 11. Значимая часть последовательности выделена жирным шрифтом. Для ПЦР-образца 1 представлен типичный профиль после проведения секвенирования в Межинститутского Центра Секвенирования ДНК.

сканера. На рисунке 1 представлено сканированное изображение полиакриламидного геля.

Результаты и обсуждение

На территории Казахстана для клинической практики достаточно выявить и различить три основных генотипа ВГС (1, 2 и 3) и соответствующие шесть субтипов (1a, 1b, 2a, 2b, 3a и 3b). На рисунке 2 представлены нуклеотидные последовательности образцов 1, 2, 5, 7, 8, 11 и типичный профиль (например, для образца 1) при проведении секвенирования, который выдается в качестве результата Межинститутского Центра Секвенирования ДНК.

Сравнивая результаты секвенирования (рисунок 2) и результат выравнивания референс-последовательностей 5'-НТО ВГС, соответствующих различным субтипам вируса гепатита С, с помощью программы CLUSTALX1.83, нуклеотидные последовательности исследованных ПЦР-образцов можно отнести к следующим генотипам:

- 1b - для ПЦР-образца 1;
- 2a – для ПЦР-образца 2;
- 3a - для ПЦР-образцов 5, 7 и 8;
- 3b - для ПЦР-образца 11.

Апробация предложенной тест-системы была проведена на реамплифицированных образцах согласно методике, представленной ранее (1). На рисунке 3 приведены сканированные изображения ДНК-биочипов после проведения анализа на семи ПЦР-образцах. Отнесение результатов каждого анализа проводили, сравнивая шаблоны со сканированным изображением ДНК-биочипа. При сопоставлении в шаблоне субтип ВГС устанавливался по колориметрическому проявлению полимеров, несущих соответствующие типоспецифические зонды.

Разработанная тест-система позволяет выявить и отнести к соответствующему типу генетический материал

ВГС. Результат анализа шести образцов (1, 2, 5, 7, 8 и 11) соответствует референс-методу (секвенирование) отнесения генетического материала, что можно увидеть при сравнении данных на рисунках 2 и 3. ПЦР-образец 9 по данным тест-системы был отнесен к генотипу 1a. Поскольку результат секвенирования данного образца было трудно отнести к определенному типу, то в дальнейшем планируется наработка ПЦР-образца 9 для подтверждения результата.

Таким образом, продемонстрирована возможность использования тест-системы на основе ДНК-биочипов для генотипирования образцов ВГС, выделенных от больных в Казахстане. Данная тест-система соответствует результатам референс-метода (секвенирование) при установлении генотипа ВГС.

**Работа выполнена в рамках Программы прикладных научных исследований Министерства здравоохранения РК «Разработка и внедрение высокоэффективных геномных технологий в диагностику и прогнозирование течения и исходов инфекционных заболеваний», № ГР 0106РК00418.*

Литература

1. Кабилов М.Р., Дымшиц Г.М., Пышный Д.В. и др. Колориметрическая детекция точечных мутаций при иммобилизации фрагмента анализируемой ДНК с продуктом лигирования на нем тандема коротких олигонуклеотидов // Институт Цитологии и Генетики СО РАН, отчетная сессия, Новосибирск, Россия – 1999.
2. Зарытова В.Ф., Пышная И.Л., Пышный Д.В., Филиппенко М.Л., Иванова Е.М. Уникальные тест-системы для выявления и генотипирования вируса гепатита С // III международная конференция «Высокие технологии в XXI веке», 31 октября – 7 ноября 2004 г., г.Бенидорм, Испания, С.35-36.