

ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ЭКСПЕРТИЗА

ИНДИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ В ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ОСНОВЕ БИОЧИПОВОЙ ТЕХНОЛОГИИ С БИОТИНОВОЙ МЕТКОЙ И КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

А.В. Локорев¹, И.М. Нитяга², Д.В. Федюшин²,
Н.Г. Хоменец³, Л.А. Шаманова¹

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский
и технологический институт биологической промышленности»
*п./о. Кашинцево, п. Биокомбинат, Щелковский р-н,
Московская область, Россия, 141142*

²ФГБОУ ВПО «Московский государственный
университет пищевых производств»
Волоколамское шоссе, 11, Москва, Россия, 125080

³Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

В работе представлены результаты разработки ДНК-чипов с биотиновой меткой и колориметрическим детектированием для индикации и идентификации возбудителей инфекций в продукции животного происхождения. Постоянная необходимость мониторинга за особо опасными инфекционными заболеваниями обуславливает актуальность разработки новых эффективных методов идентификации возбудителей этих заболеваний. Показана высокая специфичность и чувствительность методики, составляющая 10^3 — 10^4 бактериальных клеток. Анализ занимает 5—7 часов. Визуальная оценка конечного результата позволяет применять биочиповые тест-системы в стационарных и полевых условиях, лабораториях регионального уровня и референсных центрах.

Применение современной биочиповой технологии исследования позволяет быстро и с высокой достоверностью обнаруживать возбудителей инфекций в различных биологических материалах, типировать штаммы с целью установления общего источника инфекции.

Ключевые слова: чип, биочип, микрочиповая технология, биотиновая метка, идентификация возбудителей инфекций

Введение. Для оценки микробиологической безопасности продукции животного происхождения как в России, так и за рубежом хорошо зарекомендовали себя методы ДНК- и иммунодиагностики. Среди них в последнее время все больше находит применение ДНК- и иммунобиочиповая технология [1—8].

Иммуномикрочиповая технология предназначена для одновременной качественной количественной оценки нескольких образцов продукции. В основе лежит

технология микрочипа, базирующаяся на реакции антиген-антитело. Существует несколько модификаций этой технологии с использованием различных меток.

Например, технология Evidence investigator фирмы «Randox», Великобритания, заключается в следующем: на микрочипе иммобилизованы моноклональные антитела, специфичные к различным агентам (токсинам, гормонам, антимикробным веществам, возбудителям заболеваний и т.д.). На чипе проходит сэндвич-иммуноанализ. Световой сигнал, генерируемый каждой из тестовых зон микрочипа, определяется при помощи технологий получения цифрового изображения.

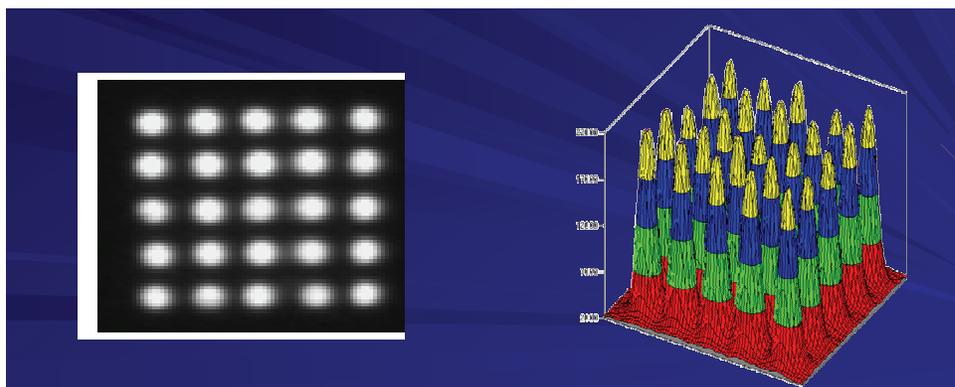


Рис. 1. Матрица распределения светового сигнала микрочипа

Количественная оценка осуществляется с помощью калибровочной кривой, которую строят по стандартам образца с известной концентрацией.

Регистрация конечного результата осуществляется с помощью хемилюминометра. Время реакции составляет от 10 до 20 минут.

Весь анализ с пробоподготовкой занимает 1—2 часа.

В нашей стране в ФГУП «ГосНИИ биологического приборостроения» ФМБА России разработана иммуномикрочиповая технология. Прибор-индикатор фосфоресценции импульсный ИФИ-03 регистрирует сигнал фосфоресценции с поверхности дна лунок микропланшетов (с чипов, выполненных в формате 96 луночных микропланшетов). Прибор также регистрирует длительную люминесценцию (технология ДЕЛФИЯ) и обычную флуоресценцию из объема жидкости в лунках микропланшета. Иммуночипы предназначены для выявления возбудителей чумы, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза, сапа и мелиоидоза и т.д.

В Германии разработан метод ПЦР-ELISA для определения возбудителя сибирской язвы в твердых образцах. Используют микротитровальные планшеты, покрытые стрептавидином, и планшеты с ковалентносвязанными олигонуклеотидами. Чувствительность теста — 10fg (фг) чистой геномной ДНК или 10 спор, высеянных на 100 г твердого материала. Методику можно представить как вариант ДНК-иммуночипового анализа [7].

Биологические микрочипы — совершенно новое направление современной аналитической биологии и медицины. В 1999 г. на основании данных о различиях в структуре 16S и 23S рибосомальной РНК разработан микрочип, способный улавливать отличия в одну пару оснований в 16S рРНК и дифференцировать как виды,

так и штаммы группы *V. cereus*. При этом только 2 из 40 штаммов других представителей группы имели последовательности 16S рРНК, идентичные *B. anthracis*, но их можно было отличить от сибиреязвенного микроба на основании анализа последовательностей 23S рРНК [4]. В современных условиях при чрезвычайных ситуациях микрочиповая технология имеет перспективу применения в виде портативных устройств для быстрого обнаружения микроорганизма и мониторинга внешней среды. Предложен способ индикации, состоящий в использовании миниатюрного ультразвукового дезинтегратора со специальным картриджем для лизиса, разрушающего споры в течение 30 секунд, с последующим быстрым анализом в реальном времени на ПЦР-микрочипе. Для извлечения ДНК из спор используют минисоникатор. Общее время извлечения и анализа ДНК, используя минисоникатор и микрочип для ПЦР, составляет 15 мин [6].

В России разработан МАГИК-чип (матрица гель-иммобилизованных компонентов на микрочипе), который состоит из массива гидрофильных ячеек гидрогеля, закрепленных на гидрофобной поверхности стекла. Основные манипуляции, необходимые для анализа нуклеиновых последовательностей (ПЦР, отделение праймеров и продуктов амплификации от субстрата, гибридизация, лигирование и т.д.), могут быть проведены в ячейках чипа. В МАГИК-чипе для обнаружения *B. anthracis* ячейки чипа содержат иммобилизованные праймеры с генами *lef* и *pag* [8].

В США также разработан метод микрочиповой твердофазной экстракции для очистки ДНК из биологических образцов, таких как кровь. Кремниевые бусы упаковывают в стеклянные микрочипы и иммобилизуют бусы золь-гелем для стабилизации твердой фазы, на которой будет адсорбироваться ДНК. Оптимальное извлечение ДНК происходит при рН 6,1—7,6. Такие низкие значения рН позволяют сократить время экстракции с 25 мин до 15 мин. При этом единственная стадия приготовления ДНК из крови для анализа на микрочипе — смешивание крови с буфером для нанесения. Процедура детекции инфекционного агента занимает менее 30 мин [8].

Цель исследований. В своей работе мы попытались разработать ДНК-чипы с биотиновой меткой и колориметрическим детектированием.

Исследуемые пробы крови или животной ткани искусственно контаминировали бактериями в концентрациях 10^5 — 10^6 м.к./мл. Затем из них выделяли ДНК. Бактерии лизировали в Трис-ЭДТА буфере, содержащем лизоцим и протеиназу К. Дальнейшую очистку ДНК проводили с помощью детергента «Silico» и магнито-сепарации. ДНК осаждали двойным объемом этанола. Проводили однократную промывку 80-процентным этанолом для осветления раствора ДНК.

Выделенную и очищенную ДНК растворяли в стандартно-солевом растворе (ССР), денатурировали в кипящей водяной бане в течение 5—10 мин, иммобилизовали на мембранные биочипы, предварительно обработанные раствором $10\times$ ССР в виде точек, не допуская их перекрывания.

Иммобилизованную ДНК гибридизовали с мечеными ДНК-зондами. В качестве ДНК-зондов использовали олигонуклеотидные ДНК последовательности, полученные с помощью ПЦР реакции с коммерческими праймерами на *B. subtilis* или *B. anthracis*, например, олигонуклеотидные праймеры, комплементарные по-

следовательностям хромосомных генов *fliC* и *hom2*, имеющие следующие последовательности:

fliC-F: 5'-TGGAGCAGTAACAATTGG-3',

fliC-R: 5'-GCACCACTGATAGAAATGTTAG-3',

hom2-F: 5'-GACGTGTTAAAAGAAGCCCA-3',

hom2-R: 5'-CACCAATTTTCGTCTTTTACA-3'.

На следующем этапе чип обрабатывали конъюгатом стрептавидина с щелочной фосфатазой. На заключительном этапе вносили субстратный раствор. Окрашивание соответствующих точек свидетельствовало о наличии искомой бактериальной ДНК в исследуемом материале.

На чип наносили 3 мл гибридационного раствора. Инкубировали чип 4 часа при 65 °С в плотно закрытой чашке Петри.

Чип отмывали трехкратно по 5 мин на качалке при комнатной температуре в 30 мл отмывочного раствора № 1. Затем отмывали двукратно по 5 мин при температуре 65 °С в 40 мл отмывочного раствора № 2. Затем отмывали однократно в течение 5 мин на качалке при комнатной температуре в 20 мл отмывочного раствора № 3.

Чип помещали в 25 мл блокирующего раствора и инкубировали 20 мин при 37 °С.

Для проведения реакции связывания конъюгата чип ополаскивали в 20 мл раствора TST и переносили в чашку Петри с парафильмом на дне. Наслаивали на чип сверху 3 мл раствора конъюгата и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре.

Чип отмывали трехкратно по 10 мин на качалке при комнатной температуре в 30 мл раствора TST и однократно в 7 мл раствора проявляющей смеси.

Переносили чип в чашку Петри с настеленным на дно парафильмом и наслаивали сверху 3 мл проявляющей смеси. Чип инкубировали в темноте при 37 °С или при комнатной температуре в течение нескольких 2—3 часов до появления окраски в пятне, содержащем контрольный положительный образец. Чип промывали в водопроводной воде для остановки проявления и высушивали, проводили оценку результата.

На рисунке 2 схематично представлены результаты окрашивания точек чипов с гибридными молекулами ДНК.

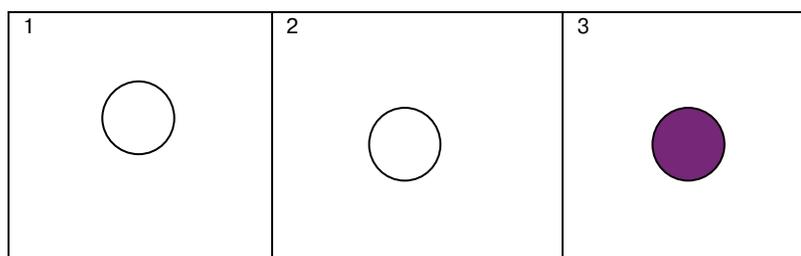


Рис. 2. Схематичные результаты окрашивания точек чипов

1 — отрицательный контроль (фон — чистый чип, без ДНК); 2 — отрицательный контроль (иммобилизованная ДНК *B. subtilis* + ДНК-зонд на *B. anthracis*); 3 — положительный контроль (иммобилизованная ДНК на *B. anthracis* + ДНК-зонд на *B. anthracis*)

В таблице 1 представлены результаты гибридизации ДНК-зондов с иммобилизованными на биочипах ДНК различных бактерий, которые показывают высокую специфичность методики.

Как видно из представленных данных, гибридизация происходит только в гомологичных системах (иммобилизованная ДНК и ДНК-зонд одного и того же вида бактерий).

Чувствительность метода составляла 10^3 — 10^4 бактериальных клеток.

Таблица 1

Специфичность методики определения возбудителей инфекций на основе биочиповой технологии с биотиновой меткой и колориметрическим детектированием

Иммобилизованная на чипе ДНК	ДНК-зонд на <i>B. anthracis</i>	ДНК-зонд на <i>B. subtilis</i>
	Степень окрашивания чипов	Степень окрашивания чипов
<i>B. anthracis</i>	++++	–
<i>B. subtilis</i>	–	++++
<i>B. cereus</i>	–	–
<i>E. coli</i>	–	–
<i>Erysipelothrix insidiosa</i> (возбудитель рожи свиней)	–	–

Примечания: (++++) — максимальное окрашивание; (–) — отсутствие окрашивания или на уровне фона.

Заключение. Разработанная методика дает возможность проводить индикацию и идентификацию возбудителей инфекций, включая особо опасные в продукции животного происхождения. Анализ занимает 5—7 часов. Визуальная оценка конечного результата позволяет применять биочиповые тест-системы в стационарных и полевых условиях.

Использование современных молекулярно-биологических методов и, в частности, биочиповой технологии исследования позволяет не только быстро и достоверно обнаруживать возбудителей инфекций в различных биологических материалах, но и типировать штаммы с целью установления общего источника инфекции.

© Локорев А.В., Нитяга И.М., Федюшин Д.В., Хоменец Н.Г., Шаманова Л.А., 2016

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] Применение иммуномикрочиповой технологии для контроля безопасности и качества пищевых продуктов / В.С. Бабунова, Д.А. Онищенко, О.А. Ярова, А.В. Артемов, М.В. Кондратьева, С.В. Луцык // Сборник ГНУ ВНИИВСГЭ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». М., 2011. № 1(5). С. 12—17.
- [2] Барский В.Е., Колчинский А.М., Лысов Ю.П., Мирзабеков А.Д. Биологические микрочипы, содержащие иммобилизованные в гидрогеле нуклеиновые кислоты, белки и другие соединения: свойства и приложение в геномике // Мол. биол. 2002. Т. 36. № 4. С. 563—584.
- [3] Кутырев В.В., Смирнова Н.И. Генодиагностика и молекулярное типирование возбудителей чумы, холеры и сибирской язвы // Мол. ген. микробиол. вирусол. 2003. № 1. С. 6—14.

- [4] Тест-системы и технические средства ускоренного контроля безопасности и качества объектов ветеринарного надзора / В.В. Светличкин, А.Б. Кононенко, С.П. Ярков, А.А. Стрелков, М.В. Кондратьева, А.И. Панюшкин // Сборник ГНУ ВНИИВСГЭ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». М., 2010. № 1. С. 26—33.
- [5] Усовершенствование контроля сальмонелл в мясе и мясных продуктах с помощью ПЦР в режиме реального времени и робототехники для выделения матричной ДНК / И.М. Нитяга, Б.В. Уша, Е.Н. Морозова, Н.Г. Хоменец // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2016. № 1. С. 61—65.
- [6] A minisonicator to rapidly disrupt bacterial spores for DNA analysis / P. Belgrader, D. Hansford, G.T. Kovacs, K. Venkateswaran, R.Jr. Mariella, F. Milanovich, S. Nasarabadi, M. Okuzumi, F. Pourahmadi, M.A. Northrup // *Anal. Chem.* 1999. Vol. 71. No. 19. P. 4232—6.
- [7] Beyer W., Pocivalsek S., Bohm R. Polymerase chain reaction-ELISA to detect *Bacillus anthracis* from soil amples-limitations of present published primers // *J. Appl. Microbiol.* 1999. Vol. 87. No. 2. P. 229—36.
- [8] Microchip-based purification of DNA from biological samples / M.C. Breadmore, K.A. Wolfe, I.G. Arcibal, W.K. Leung, D. Dickson, B.C. Giordano, M.E. Power, J.P. Ferrance, S.H. Feldman, P.M. Norris, J.P. Landers // *Anal. Chem.* 2003. Vol. 75. No. 8. P.1880—6.
- [9] Development of an Evidence biochip array kit for the multiplex screening of more than 20 anthelmintic drugs / J. Porte, N. oLoan, B. Bell, J. Mahoney, M. McGarrity, Rl. McConnell, S.P. Fitzgerald // *Anal. Bioanal Chem.* 2012 Jul. 403(10). P. 3051—6.

INDICATION AND IDENTIFICATION OF INFECTIOUS AGENTS IN ANIMAL PRODUCTS BASED ON BIOCHIP TECHNOLOGY WITH A BIOTIN LABEL AND COLORIMETRIC DETECTION

**A.V. Lokorev¹, I.M. Nityaga², D.V. Fedyushin²,
N.G. KHomenets³, L.A. Shamanova¹**

¹FGBNU “All-Russian Research and Technology Institute of Biological Industry”
p. Biokombinat, n. Kashintseva, Shchelkovo district, Moscow region, Russia, 141142

²FGBOU VPO “Moscow State University of Food Production”
Volokolamsk highway, 11, Moscow, Russia, 125080

³Peoples’ Friendship University of Russia
Miklykho-Maklaya str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

The results of the development of DNA chips with biotin uterus and colorimetric detection to indicate and identify pathogens in animal products. The constant need to monitor for dangerous infectious diseases makes the urgency of developing new effective methods of identification of pathogens of these diseases. The high specificity and sensitivity of the technique, is 10^3 — 10^4 bacterial cells. The analysis takes 5—7 hours. Visual assessment of the end result allows for biochip test systems in stationary and field conditions, laboratories and regional reference centers.

The application of modern biochip technology research quickly and with high reliability to detect infectious agents in a variety of biological materials, typified by strains in order to establish a common source of infection.

Key words: chip, biochip, microarray technology, a biotin label, the identification of infectious agents

REFERENCES

- [1] Babunova V.S., Onishhenko D.A., Jarova O.A., Artemov A.V., Kondrat'eva M.V., Lucyk S.V. Primenenie immunomikrochipovoj tehnologii dlja kontrolja bezopasnosti i kachestva pishhevych produktov. *Sbornik GNU VNIIVSGJe «Problemy veterinarnoj sanitarii, gigieny i jekologii»*. M., 2011. № 1(5). S. 12—17.
- [2] Barskij V.E., Kolchinskij A.M., Lysov Ju.P., Mirzabekov A.D. Biologicheskie mikrochipy, sodержashhie immobilizovannye v gidrogele nukleinovye kisloty, belki i drugie soedinenija: svoystva i prilozhenie v genomike. *Mol. biol.* 2002. T. 36. № 4. S. 563—584.
- [3] Kutyrev V.V., Smirnova N.I. Genodiagnostika i molekularnoe tipirovanie vozbuditelej chumy, holery i sibirskoj jazvy. *Mol. gen. mikrobiol. virusol.* 2003. № 1. S. 6—14.
- [4] Svetlichkin V.V., Kononenko A.B., Jarkov S.P., Strelkov A.A., Kondrat'eva M.V., Panjushkin A.I. Test-sistemy i tehicheskie sredstva uskorennoho kontrolja bezopasnosti i kachestva ob'ektov veterinarnogo nadzora. *Sbornik GNU VNIIVSGJe «Problemy veterinarnoj sanitarii, gigieny i jekologii»*. M., 2010. № 1. S. 26—33.
- [5] Nitjaga I.M., Usha B.V., Morozova E.N., Homenec N.G. Uovershenstvovanie kontrolja sal'monell v mjase i mjasnyh produktah s pomoshh'ju PCR v rezhime real'nogo vremeni i robototehniki dlja vydelenija matrichnoj DNK. *Vestnik Rossijskogo universiteta družby narodov. Serija: Agronomija i zhivotnovodstvo*. 2016. № 1. S. 61—65.
- [6] Belgrader P., Hansford D., Kovacs G.T., Venkateswaran K., Mariella R.Jr., Milanovich F., Nasarabadi S., Okuzumi M., Pourahmadi F., Northrup M.A. A minisonicator to rapidly disrupt bacterial spores for DNA analysis. *Anal. Chem.* 1999. V. 71. N. 19. P. 4232—6.
- [7] Beyer W., Pocivalsek S., Bohm R. Polymerase chain reaction-ELISA to detect *Bacillus anthracis* from soil amples-limitations of present published primers. *J. Appl. Microbiol.* 1999. V. 87. N. 2. P. 229—36.
- [8] Breadmore M.C., Wolfe K.A., Arcibal I.G., Leung W.K., Dickson D., Giordano B.C., Power M.E., Ferrance J.P., Feldman S.H., Norris P.M., Landers J.P. Microchip-based purification of DNA from biological samples. *Anal. Chem.* 2003. V. 75. N. 8. P. 1880—6.
- [9] Porte J., oLoan N., Bell B., Mahoney J., McGarrity M., McConnell Rl., Fitzgerald SP. Development of an Evidence biochip array kit for the multiplex screening of more than 20 anthelmintic drugs. *Anal. Bioanal Chem.* 2012 Jul. 403(10). R.3051—6.