

ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ГРОМАДСЬКЕ ОБ'ЄДНАННЯ «ІНСТИТУТ ЄДИНОГО ЗДОРОВ'Я»
НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР «ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ»

Молекулярно-генетичні методи діагностики



Навчальний посібник

Полтава 2022

УДК 619:616.98-078:636

Розглянуто та схвалено Вченою радою Полтавського державного медичного університету протокол № 3 від 30 листопада 2022 р.

Герілович А.П., Єрошенко Г.А., Коровін І.В., Кінаш О.В., Герілович І.О., Родина Н.С. Молекулярно-генетичні методи діагностики. – 2022. – 148 с.

Представлений посібник містить опис основних молекулярно-генетичних методів у системі лабораторної діагностики інфекційних та інвазійних хвороб людей і тварин, методології розробки методик на основі полімеразної ланцюгової реакції – основного методу генодіагностики інфекційних, інвазійних і спадкових захворювань, напрацювання матеріалу для проведення поглиблених досліджень з гено-, патотипування та поглибленої диференціації мікро- та макроорганізмів. Наведено основні відомості щодо будови нуклеїнових кислот, генів і геномів мікроорганізмів, висвітлено біофізичні механізми полімеразної ланцюгової реакції, її основних модифікацій, інших ампліфікаційних та неампліфікаційних методів виявлення геномів збудників інфекційних хвороб. Описані методології гено- та патотипування патогенів тварин за секвенуванням (класичним та нового покоління, NGS) і філогенетичним аналізом послідовностей їх генетичного матеріалу.

Представлений посібник має теоретичне та практичне значення для широкого кола спеціалістів. Він може бути використаний при викладанні освітніх компонент «біологія» та «лабораторна діагностика» для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня та освітньої компоненти «біологія» на третьому (освітньо-науковому) рівні.

Рецензенти:

Геращенко С.Б. – д.мед.н., професор, завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології Івано-Франківського національного медичного університету

Небесна З.М. - д.б.н., професор, завідувачка кафедри гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського

Білаш С.М. - д.б.н., професор, завідувач кафедри анатомії з клінічною анатомією та оперативною хірургією Полтавського державного медичного університету

ЗМІСТ

Передмова	4
1. Значення молекулярно-генетичних методів у медицині та біології в умовах сьогодення.....	6
2. Нуклеїнові кислоти: структура та функції	14
3. Гени і геноми мікроорганізмів	28
4. Методи молекулярної діагностики	32
5. Теоретичні аспекти ампліфікаційних методів аналізу нуклеїнових кислот.....	35
Види полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).....	37
Підбір ділянок для ампліфікації.....	39
Розробка праймерів.....	48
Оптимізація ПЛР-протоколів.....	59
Інші ампліфікаційні методи аналізу нуклеїнових кислот.....	61
Методи ізотермальної ампліфікації.....	66
6. Практичні аспекти ампліфікаційних методів аналізу.....	67
Організація роботи діагностичних ПЛР-лабораторій.....	67
Загальні підходи до підготовки зразків.....	70
Реакція ампліфікації (власне ПЛР). Варіанти ПЛР. Classic-ПЛР.....	73
Електрофорез: облік та інтерпретація результатів ПЛР.....	75
Real-time-ПЛР.....	79
Причини неспецифічних і хибних результатів за ПЛР-аналізу.....	80
7. Секвенування та біоінформатичний аналіз послідовностей нуклеїнових кислот.....	83
8. Методи гібридизації.....	113
9. Рекстрикційно-ензимний аналіз	122
10. Роль і практичне застосування молекулярної діагностики у медицині.....	123
11. Біотехнології рекомбінантних ДНК/РНК. Виготовлення, контроль якості та аспекти біобезпеки при застосуванні імунобіологічних препаратів	129
Залучення технологій рекомбінантних ДНК/РНК до процесів виготовлення імунобіологічних препаратів.....	129
Контроль якості та безпечності імунобіологічних препаратів на основі рекомбінантних ДНК/РНК.....	133
Регламентация біобезпеки при застосуванні рекомбінантних технологій.....	136
Нормативна база відносно створення та застосування рекомбінантних імунобіологічних препаратів у світі та Україні.....	137
12. Бібліографія.....	141

Передмова

Глобальні процеси міграції людей та розширення господарчих, торгівельних, політичних та соціальних зв'язків у сучасному світі значним чином впливає на розвиток, організацію та існування біологічних систем. У цих умовах живий світ сприймається як одне ціле, у результаті чого неможливо розглядати окремо проблеми охорони здоров'я людей, здоров'я та благополуччя тварин і безпеку довкілля. Тісні взаємозв'язки цих сфер народжують комплексні підходи підтримання стабільності біологічних систем, які формують собою принцип "Єдине здоров'я".

Основну небезпеку для здоров'я людини та тварин становлять інфекційні хвороби. Збудники цих хвороб є першопричиною біологічних загроз. Найбільш небезпечними з їх числа є, так звані, емерджентні інфекції (від англ. emergency – надзвичайний, непередбачуваний випадок) – це інфекційні та інвазійні хвороби людини, тварин і рослин, що раптово виникають як нова нозодиниця в результаті біологічної еволюції або через застосування біологічної зброї, та супроводжуються створенням надзвичайних епізоотичних ситуацій в країні або регіоні, складаючи загрозу біологічній та продовольчій безпеці, з певними економічними та соціальними наслідками.

Емерджентними, згідно з визначенням ВООЗ та МЕБ є інфекції, які виникають вперше у світі або на окремо взятій території, швидко та широко розповсюджуються, загрожують здоров'ю людей та тварин на регіональному або світовому рівнях (африканська чума свиней, блютанг, хвороба Шмалленберг, лихоманки Ебола, долини Ріфт, Західного Нілу, Близькосхідний респіраторний синдром, губчаста енцефалопатія).

Також критеріями емерджентності є відсутність засобів ефективного лікування та профілактики, тенденції до неконтрольованого транскордонного поширення, у т.ч. через вектори (дику фауну та комах (трансмисивні хвороби). На цих засадах з 1821 інфекційного агента людини 211 визначено як збудників емерджентних інфекцій, з яких майже 75 % є зооантропонозами. Так, на сьогодні засобів профілактики не мають – лихоманки Хендра та Ніла, хантавірусний енцефаліт, атипова пневмонія, високопатогенний грип птиці «нового» типу (H5N8), нові пестивірусні інфекції (вірусна діарея ВРХ 3-го типу). Кожен 10-й ізолят сальмонел, кожен 14-й – S.aureus, кожен 120-й – M. tuberculosis є нечутливими до дії традиційних антимікробних речовин.

Досконалий контроль інфекційних хвороб людини, тварин та рослин ґрунтується на ранній та специфічній їх діагностиці. Саме в сфері лабораторної діагностики інфекційних хвороб народжуються якісно нові та ефективні технології, засновані на інтеграції у гуманну та ветеринарну медицину здобутків молекулярної біології та генетики, геноміки та біотехнології.

Завдяки такій міждисциплінарній інтеграції виникла ціла низка наукових напрямів, що стрімко увійшли до наукової та практичної роботи, ставши гідним доповненням класичної мікробіології, вірусології, епізоотології та епідеміології.

Зокрема, сьогодні все більше уваги приділяється трьом субдисциплінам, які акумулювали в себе як традиційні, так і молекулярно-біологічні знання та

методи. Це, перш за все, молекулярна діагностика, молекулярна епідеміологія та епізоотологія, а також молекулярна біотехнологія.

Метою представленого видання є розкриття самої суті цих напрямів, їх ідеї та перспектив раціонального застосування в області гуманної та ветеринарної медицини. Про їх актуальність свідчать обсяги застосування та впровадження означених інновацій у сучасному світі. З числа наукових публікацій на медичну, ветеринарну або загальнобіологічну тематику, які розміщені на сторінках цитованих журналів світу, 90–100 % включають дані, отримані з залученням методів і методик молекулярної біології. Імунологічні реакції, функціонування організму в умовах норми та патології вивчаються з позицій молекулярних механізмів і реакцій.

Ідея цього видання виникла у зв'язку з відсутністю інформаційного забезпечення щодо ролі та місця молекулярно-генетичних методів в практиці сучасної біології та медицини і в проведенні науково-дослідних робіт з вивчення інфекційних агентів та механізмів їх впливу на живий організм, створення засобів діагностики та профілактики хвороб. У рамках виконання чисельних проектів щодо стримування біологічних загроз і ризиків нами було відмічено значне збільшення ролі саме молекулярно-генетичних досліджень: виникли нові та були вдосконалені існуючі методи молекулярної діагностики та біотехнології. Це надихнуло нас на підготовку даного видання з метою узагальнення накопиченого досвіду та вдосконалення системи підготовки профільних спеціалістів.

У представленому посібнику йде мова про загальні базові поняття в галузі молекулярної біології та біотехнології. Показано роль та місце молекулярної діагностики, молекулярної епідеміології та епізоотології в системі сучасної лабораторної діагностики інфекційних хвороб і в біопромислових процесах. Висвітлено основні методологічні підходи, що дозволяють реалізувати зазначені дослідження.

Посібник призначений для широкого кола читачів, оскільки ставить на меті популяризацію напряму молекулярно-генетичних досліджень в умовах необхідності їх якнайшвидшого впровадження до практики медицини та біології.

*Антон ГЕРІЛОВИЧ,
доктор ветеринарних наук,
професор, член-кореспондент НААН*

1. Значення молекулярно-генетичних методів у медицині та біології в умовах сьогодення

Поява нових пандемічних та панзоотичних загроз у сучасному світі спонукає науковців приділяти значну увагу фундаментальним дослідженням інфекційного, епідемічного та епізоотичного процесів, а також супроводу біотехнологічних операцій із залученням молекулярно-генетичних методів.

Особливу небезпеку для здоров'я людей і тварин складають хвороби, які характеризуються аерогенним (аерозольним, повітряно-краплинним) шляхом поширення, до числа яких відносяться ортоміксовірусні (в першу чергу грип А), аденовірусні та коронавірусні інфекції. Їм притаманні високі рівні захворюваності, виключно висока контагіозність збудників, значні летальні ризики. Найбільшу небезпеку при цьому становлять захворювання, етіологічно зумовлені РНК-вміщуючими вірусами, котрі завдяки своїй мінливості за рахунок мутацій і рекомбінацій геному та антигенного складу здатні обходити захисні механізми імунної системи макроорганізму (у т.ч. поствакційний імунітет), долати видові бар'єри сприйнятливості до інфікування та підвищувати рівень своєї патогенності.

Так виникнення нових видів коронавірусів, які є патогенними для людини, спричинює значний негативний вплив на соціально-економічний розвиток як окремих країн і регіонів, так і всього світу. У цьому аспекті найбільшого значення набули захворювання на тяжкий гострий респіраторний синдром, ТГРС або атипову пневмонію (SARS-CoV, епідемія в Азії 2002–2003 рр., 8 096 захворілих, 774 загиблих) (National Health Service (England), 2019), близькосхідний коронавірусний респіраторний синдром, БКРС (MERS-CoV, спалахи в Азії 2012–2015 рр., 2 538 захворілих, 871 загиблих) (WHO, 2020) та нову коронавірусну інфекцію — COVID-19 (SARS-CoV-2, пандемія якої розпочалася наприкінці 2019 р., захворілих близько 240 млн. осіб, загиблих за даними ВООЗ — 4,9 млн. осіб, станом на 01.12.2021 р.) (WHO, 2021).

Внаслідок глобальної емерджентної ситуації щодо коронавірусної інфекції людини, яка склалася в сучасному світі, перед науковцями та практиками медичного та загальнобіологічного профілів постало нагальне завдання зі створення засобів моніторингу, діагностики, лікування та, насамперед, профілактики COVID-19-інфекції.

Висока контагіозність та патогенність збудника SARS-CoV-2 вимагає значних витрат, як фінансових, так і трудових ресурсів, задля забезпечення відповідних стандартів біологічної безпеки та біозахисту при роботі з патогеном. Внаслідок цього в сучасному світі все більшої ваги набирають біологічно та екологічно безпечні та досить конкурентні в економічному плані технології, пов'язані з використанням молекулярно-біотехнологічних підходів, зокрема технологій рекомбінантних ДНК.

Охопити весь той значний масив результатів досліджень, що були отримані за часи застосування молекулярно-генетичних методів у лабораторній діагностиці емерджентних, соціально та економічно значущих хвороб людини,

тварин і рослин, неможливо внаслідок їх всеохопності та різноманітності, однак є сенс охарактеризувати в цьому підрозділі основні їх напрями.

До їх числа можна віднести загальнобіологічний, біотехнологічний, медичний (лабораторна діагностика в гуманній та ветеринарній медицині) аспекти використання молекулярно-генетичних методів, яким і присвячується представлений посібник.

Молекулярно-генетичні дослідження загальнобіологічного напрямку пов'язані з вивченням біологічних особливостей мікро- і макроорганізмів, їх еволюції, філогеографії, екології, систематики тощо. Умовно цю групу методів можна розподілити на методи ідентифікації та поглибленого аналізу нуклеїнових кислот і білкових молекул, що ними кодуються. Основним завданням цих методологій є дослідження ДНК, РНК і протеїнів з метою класифікації біологічних об'єктів, вивчення їх спорідненості та прогнозування ймовірних змін і мутацій. Означений науковий напрям дозволив вивчити структуру та регуляцію генів тварин, людини та мікроорганізмів, ідентифікувати та більш точно класифікувати біологічні види, особливо це стосується мікроорганізмів, поглибити їх класифікацію та оцінити еволюційні процеси на популяційному рівні, дослідити нові особливості екології біологічних видів, вивчити мікробіоти почви, води, повітря та макроорганізмів.

З точки зору ветеринарної науки цей аспект молекулярно-генетичних досліджень забезпечує проведення фундаментального аналізу геномів свійських і диких тварин, пояснює ряд механізмів формування стійкості до інфекційних захворювань, характеризує функціональні особливості генів імунокомпетентних протеїнів, що регулюють механізми клітинного та гуморального імунітету при вірусних і бактеріальних захворюваннях. У доступній літературі є повідомлення про вивчення характеру експресії генів інтерферону та цитокінів у різних видів свійських тварин, що є великим успіхом у розвитку молекулярної імунології та відводить ключове місце молекулярно-генетичним методам у цих дослідженнях.

Розвиток методів повногеномного секвенування нового покоління (next generation sequencing, NGS) відкрив нові перспективи у дослідженні не просто окремих збудників, але й у розгортанні дослідження цілих мікробіомів. Це дозволило заглибитись у вивчення механізмів співіснування та впливу на макроорганізми мікробіоценозів, охарактеризувати цілий ряд нових видів мікроорганізмів, включаючи некультивовані форми тощо.

Загальнобіологічні дослідження стали теоретичним підґрунтям для зародження та розвитку таких нових дисциплін, як молекулярна вірусологія, молекулярна патологія та молекулярна епідеміологія (епізоотологія). Вивчення біологічних особливостей вірусів, бактеріальних та грибкових патогенів, а також найпростіших дозволило значно поглибити знання про характер і механізми патогенезу ряду інфекцій, зокрема, таких як грип, нову коронавірусну хворобу COVID-19, туберкульоз, ящур, герпесвірози тощо, удосконалити класифікацію збудників. Ґрунтуючись на цих даних, по-перше, були сформульовані основні напрями дослідження мінливості патогенів, а, по-друге, визначено основні стратегії розробки систем контролю цих інфекцій шляхом створення засобів їх моніторингу, діагностики та специфічної профілактики.

Важливим аспектом застосування молекулярно-генетичних методів є біотехнологічний напрям. Так, завдяки інтеграції сучасних методів молекулярної генетики в біотехнологію стало ймовірним значно розширити можливості щодо селекції та паспортизації виробничих штамів, контролювання біотехнологічних процесів і готової продукції, а також створення нових форм препаратів на основі синтетичних послідовностей нуклеїнових кислот та продуктів рекомбінантних біотехнологій (нуклеїнових кислот, діагностичних та імуногенних антигенів, антитіл рекомбінантного походження).

Методи молекулярної генетики також знаходять застосування в системі контролю якості біотехнологічної продукції, а саме вивчення контамінації сировини та готових біопрепаратів сторонніми агентами, зокрема, вірусами та мікоплазмами, при експертизі щодо наявності сировини модифікованих організмів і патогенів у кормах та продуктах харчування. З цією метою в ряді країн до біотехнологічної практики залучено якісні та кількісні методи визначення наявності специфічних і неспецифічних патогенів у складі імунобіологічних препаратів. Наприклад, полімеразну ланцюгову реакцію, ПЛР, застосовують при контролі культур клітин щодо контамінації мікоплазмами, пести-, цирко- та ретровірусами. Те саме стосується виробничих штамів і готової продукції. Клітинні культури, що застосовуються в біотехнологічних процесах, оцінюють також за показниками автентичності за допомогою методів цитогенетичного аналізу, який також включає методи генотипування, засновані на виявленні видових маркерів, гібридизації *in situ* та інших ампліфікаційних та неампліфікаційних методах аналізу.

Великої уваги на сьогоднішній день заслуговують методи дослідження вмісту генетично модифікованих продуктів. Існує реєстр максимально допустимих кількостей вмісту сировини з генетично модифікованих організмів у продуктах харчування, а також перелік дозволених генетичних модифікацій для певних видів та сортів рослин.

Досвід молекулярної генетики знайшов місце і власне у процесі біотехнологічного виробництва. Першим досить важливим напрямом цієї інтеграції стали створення, валідація та впровадження діагностичних наборів для індикації та диференціації вірусних і бактерійних геномів з використанням полімеразної ланцюгової реакції (як класичної, так і в режимі реального часу), гібридизації *in situ*, ізотермальної ампліфікації ДНК та РНК, технологій гібридизації та мікрочіпування, а також різних модифікацій рестрикційного аналізу та секвенування.

Системи індикації та ідентифікації патогенів за допомогою молекулярно-генетичних методів у процесі розроблення проходять різні наукоємні та технічні етапи.

Так, при створенні ПЛР-тестів конструюють праймери і зонди, напрацьовують позитивні зразки та буферні системи. ПЛР-діагностикуми розподіляють за методиками на основі класичної ПЛР: моноступневої (індикація одного виду мікроорганізму за одним геном у одноцикловій реакції), дуплексної – duplex-ПЛР (індикація одного збудника за двома генами з метою підвищення специфічності детекції), мультиплексної – multiplex (індикація одного збудника

за кількома (більше двох) генами, або індикація кількох різних збудників) та nested-ПЛР (індикація одного збудника в двостадійній реакції з метою підвищення чутливості детекції, або індикація з наступним типуюванням), а також ПЛР у режимі реального часу (підрозділяється на прості, одностадійні варіанти ПЛР, мультиплексні, напівкількісні та кількісні). Означені діагностикуми забезпечують швидку, високочутливу та високоспецифічну детекцію патогенів за виявленням нуклеїнових кислот. За таким же сценарієм розробляється і ряд інших форматів молекулярно-генетичних діагностикумів на основі ампліфікаційних методів. Значно варіює їх ціновий діапазон, що залежить від використовуваної платформи, лінійки та виробника витратних матеріалів, трудомісткості та потреб в обладнанні лабораторій.

Виробники пропонують споживачеві системи індикації та генотипування мікроорганізмів бактеріальної та вірусної природи на основі гібридизації *in situ* та технологій мікрочіпів. Процес виготовлення цих тест-систем, чия дія ґрунтується на гібридизації мічених зондів з ДНК/РНК-матрицями, базується на розробці специфічних зондів і буферних систем. У випадку застосування методів, що передбачають використання мікрогібридизаційних планшетів і мікроносіїв, до технологічних етапів виробництва долучаються виготовлення та імобілізація підложок-носіїв специфічних олігонуклеотидів, мічених флуорофорами чи іншими хімічними мітками кольорового ряду.

Визначну роль знаходить застосування молекулярно-генетичних методів у системі виробництва біопрепаратів для гуманної та ветеринарної медицини. Якщо в режимі виявлення патогенів вони використовуються для індикації та ідентифікації контамінантів препаратів та сировини, а також як методи визначення автентичності виробничих культур та штамів, то важливим є їх місце в молекулярній біотехнології. Першочерговим завданням при цьому є розробка лікарських форм, діагностичних препаратів та біостимуляторів рекомбінантного походження, тобто, отриманих за допомогою засобів та інструментів генної інженерії.

На сьогодні описано чимало прикладів створення рекомбінантних антигенів для виготовлення діагностичних та імунопрофілактичних препаратів. Перевагою отриманих рекомбінантним шляхом антигенів для виявлення антитіл є їх безумовно вища специфічність у порівнянні до нативних, тобто вірусного чи бактеріального походження. Процес їх очищення не такий трудомісткий та витратний, що пояснюється відсутністю або значно меншим вмістом у них баластних речовин, які можуть зумовити неспецифічні реакції. Регуляція синтезу цільових протеїнів у експресуючих системах може бути, по-перше, контрольованою, а, по-друге, дуже ефективною внаслідок наявності високопродуктивних експресуючих векторів.

Є дані відносно використання рекомбінантних антигенів для виготовлення ELISA-тест-систем з виявлення антитіл до вірусів ВІЛ, грипу, нового пандемічного варіанту коронавірусу людини (SARS-CoVi-2) та багатьох інших збудників вірусної та бактеріальної природи для потреб діагностики в медицині, а також високопатогенного грипу, ньюкаслської хвороби, РРСС, африканської та класичної чуми свиней, ІРТ, хвороби Ауескі, хвороби Марека тощо для

ветеринарної медицини. Крім високої специфічності, ці препарати в процесі виготовлення не потребують створення спеціальних умов щодо роботи з високопатогенними збудниками, що здешевлює виробництво за рахунок зменшення витрат на обладнання приміщень. Навіть роботи з ізольованим для генно-інженерних маніпуляцій генетичним матеріалом особливо небезпечних збудників можна проводити в умовах спрощених вимог щодо біобезпеки та біозахисту.

При ряді інфекцій рекомбінантні вакцинні антигени індукують більш інтенсивну імунну відповідь у порівнянні з інактивованими нативними вакцинами, потребують введення в меншій дозі та є менш реактогенними. Рекомбінантні препарати, де один вірусний імуноген може бути і вектором для експресії сторонніх генів інших збудників, стали популярними спочатку при конструюванні противірусних вакцин для птахівництва, а зараз інтенсивно завойовують сектор імунобіологічних препаратів для гуманної медицини. У тому числі цей принцип використаний виробниками вакцин проти COVID-19-інфекції.

Прогресивним і найбільш сучасним напрямом молекулярної біотехнології є створення новітнього покоління вакцинних препаратів на основі рекомбінантних ДНК (ДНК-вакцини) та РНК (РНК-вакцини, наприклад продукти компаній Pfizer та Moderna проти COVID-19). Цей тип засобів специфічної профілактики є найбільш перспективним, оскільки повністю виключається механізм застосування антигенів нативного вірусу чи живих збудників інфекційних хвороб.

Медико-ветеринарне значення методів молекулярної генетики зводиться до трьох основних аспектів: забезпечення клінічної молекулярної діагностики, молекулярно-епізоотологічні (епідеміологічні) дослідження та ветеринарно-санітарна експертиза продуктів харчування.

Методи молекулярної діагностики все більш впроваджуються до системи контролю захворювань. Вони базуються на застосуванні тестів з індикації та диференціації патогенів, а також виявленні генетичних аномалій за детектування та наступного аналізу нуклеїнових кислот і білків. Впроваджені підходи генодіагностики можна розподілити на методи індикації та методи типування. Основою тестів з індикації є полімеразна ланцюгова реакція, рестрикційний аналіз і гібридизаційні протоколи. З метою ж типування застосовують різні ампліфікаційні та неампліфікаційні методи аналізу нуклеїнових кислот.

Оцінка даних типування популяцій циркулюючих збудників інфекційних захворювань людей та тварин з урахуванням територіальних, статевовікових та інших особливостей перебігу епідемічного та епізоотичного процесів зосереджує результати діагностичних досліджень у площині молекулярної епідеміології та молекулярної епізоотології – наук, які досліджують фактори ризику генетичного та екологічного походження, що ідентифікуються при інфекційних та інвазійних захворюваннях людини і тварин на молекулярному рівні з метою оцінки етіології, поширення, патогенезу та характеру превентивних заходів, що проводяться по відношенню до конкретно узятото захворювання або комплексу захворювань.

Основними завданнями молекулярної епідеміології та молекулярної епізоотології є:

1. Дослідження, аналіз та опис хазяїноспецифічності та географічного походження збудників інфекційних (бактерійної та вірусної етіології) та паразитарних захворювань людей і тварин.

2. Розробка системи профілактичних заходів через застосування методологічних підходів молекулярної діагностики.

3. Запобігання поширенню неконтагіозних захворювань і генетичних патологій шляхом спрямованого скринінгу потенційних груп ризику.

При цьому основними об'єктами дослідження молекулярної епідеміології та молекулярної епізоотології є мінливість патогенних мікроорганізмів (фенотипові та генетичні ознаки); штам, як локальна популяція, його геномна й антигенна паспортизація; епізоотичні, міжепізоотичні, персистентні, природно та штучно атенуйовані, а також інші різновиди чинника, його вірулентність (фактори та детермінанти), контагіозність, коло хазяїв, характерні особливості патогенезу; молекулярно-генетичні маркери інфекції, механізми латенції та персистенції; екологія, поширення бактерійних і вірусних популяцій, їх видозмінення під впливом макроорганізму та факторів довкілля тощо.

Потужним інструментом молекулярної діагностики є не лише лабораторні тести, а й численні методи обробки даних, які, використовуючи інструменти біоінформатики, дозволяють проводити множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей, їх аналізувати та анотувати, порівнювати, вивчати філогенетичні зв'язки, а також здійснювати дизайн праймерів та плазмідних векторів тощо.

Застосування ПЛР та інших молекулярно-генетичних методів у практиці ветеринарно-санітарної експертизи продуктів тваринництва та оцінки якості й безпечності продуктів харчування і кормів на сьогодні зосереджене на виявленні патогенів бактерійної та вірусної природи. У літературі є повідомлення про оцінку контамінації продуктів харчування лістеріями, мікобактеріями, ентеробактеріями, паразитами та вірусами, у тому числі, збудниками зоонозів. Цей напрямок роботи є дуже перспективним, оскільки сприяє підвищенню якості продуктів харчування та безпечності їх для людини.

Розробку та впровадження до системи контролю інфекційних захворювань і імунобіологічних препаратів інноваційних методів молекулярної діагностики, епідеміології, епізоотології та біотехнології можна визнати як пріоритетний вектор удосконалення вітчизняної практики гуманної та ветеринарної медицини, а також розвитку біотехнології в умовах сучасності.

На сьогоднішній день полімеразна ланцюгова реакція є першоосновою комплексу методів молекулярної діагностики з виключним медичним, ветеринарним та загальнобіологічним значенням.

Основний принцип її полягає в багаторазовому копіюванні специфічної ділянки генетичного матеріалу. Це дозволяє провести індикацію чинника захворювання на самому початку інфекційного процесу, що робить можливим більш повно оцінити епізоотичну ситуацію та своєчасно відреагувати в напрямку

знешкодження джерел інфекції. У загально біологічному значенні це дозволяє вивчити генотипову належність, провести ідентифікацію особи, встановити породну належність тварин, їх стать і виявити ймовірні маркери спадкових захворювань людини і тварин.

Окрім чутливості, методам молекулярної діагностики властивий високий рівень специфічності. Зокрема, на теперішній час розроблені та впроваджуються у лабораторну практику родо-, видо- і серотипоспецифічні ПЛР-тест-системи. При багатьох захворюваннях можливо диференціювати циркулюючий штам збудника на предмет його вакцинної або інфекційної природи.

Так, для практики гуманної медицини розроблені тести для діагностики майже всіх інфекційних захворювань: COVID-19 (SARS-CoVi-2), ВІЛ, інших вірусних та бактеріальних інфекцій, які вражають систему травлення, респіраторну та репродуктивну системи. У ветеринарній медицині розроблено засоби діагностики лейкозу ВРХ, туберкульозу (з можливістю видової ідентифікації мікобактерій), хламідіозу, лептоспірозу, вірусної діареї, інфекційного ринотрахеїту, мікоплазмозів усіх видів с.-г. тварин і птиці, трансмісивного гастроентериту, респіраторно-репродуктивного синдрому та класичної чуми свиней, ньюкаслської хвороби, хвороби Марека, інфекційного бронхіту, грипу птиці тощо.

Окрім того, ПЛР широко застосовують для створення молекулярно-генетичного картування та маркування порід с.-г. тварин і птиці, як інструмент супроводу в направленій селекції та оцінці резистентності тварин і рослин.

Важливе значення ПЛР останнім часом надається при оцінці якості, генетичної та екологічної безпечності сільськогосподарської продукції і сировини, а також продуктів харчування в контексті застосування рекомбінантних лікувально-профілактичних препаратів і ГМ-рослин.

В Україні молекулярні методи діагностики інфекційних захворювань, зокрема ПЛР, набувають все більшої ваги. З метою гармонізації нормативної документації нашої держави з положеннями ВООЗ та МЕБ молекулярні методи аналізу мають бути включеними до інструкцій і методичних рекомендацій щодо діагностики та боротьби з інфекційними захворюваннями людини і тварин.

Як свідчить досвід проведеної роботи, дослідження, виконані на молекулярно-генетичному рівні, дозволяють у короткі строки оцінити епізоотичну ситуацію, суттєво зберегти час на вживання запобіжних заходів, скорегувати схеми імунопрофілактики та звести економічні збитки до мінімуму.

Висока чутливість, специфічність та експресність методів генодіагностики при порівняно невисокій вартості досліджень є запорукою надійного контролю якості сільськогосподарської продукції.

Отже, на сьогоднішній день перспективно застосовувати метод ПЛР та інші молекулярно-генетичні методи і технології для діагностики інфекційних захворювань людини і тварин, вибіркового скринінгу в оздоровлюваних щодо лейкозу та туберкульозу тваринницьких господарствах, контролю контамінації сперми племінних тварин, якості інкубаційного яйця та продуктів тваринництва, що ввозяться до України та вивозяться за її межі.

Ампліфікаційні методи, і, зокрема, полімеразна ланцюгова реакція є першим етапом для вивчення рестрикційного профілю окремих генів збудників інфекційних захворювань людей та тварин (тести з визначення патогенності та резистентності мікроорганізмів), для визначення нуклеотидних послідовностей генів (секвенування), детекції мутацій, філогенетичного аналізу. За допомогою ПЛР накопичують цільові ділянки рекомбінантних ДНК.

Від запровадження реакції до теперішнього часу з'явилося чимало її модифікацій, які мають різне призначення, охоплюючи численні напрями науки та практики, – від генодіагностики до судово-медичної експертизи, від біотехнології лікарських речовин до харчової та полімерної промисловості.

З-поміж усіх напрямів науки та практики, для яких метод ПЛР відіграє провідну роль, найбільш пріоритетними, стосовно медицини, є питання генодіагностики, молекулярної епідеміології та епізоотології, а також молекулярної біотехнології лікарських засобів та засобів специфічної профілактики інфекційних хвороб.

Застосування сучасних методів досліджень в області молекулярної біотехнології дозволило здійснити ряд важливих відкриттів у розвитку імунодіагностики та профілактики інфекційних захворювань людини, тварин і птиці: розроблені рекомбінантні антигени вірусів лейкозу та грипу, герпес- та інших вірусів свійських тварин. Суттєвою перевагою цих продуктів з точки зору діагностики є їх висока специфічність, що зумовлено їх більш ефективним очищенням, та менша собівартість.

У сфері гуманної медицини широкого застосування набувають рекомбінантні та ДНК/РНК-вакцини проти нової коронавірусної хвороби COVID-19 (збудник SARS-CoVi-2), грипу, гепатитів В та С, ВІЛ-інфекції та ін., які мають високу імуногенність та нижчу за традиційні вакцини реактогенність. Окрім того, завдяки технологіям рекомбінантних ДНК, налагоджений випуск високоякісних інсулінів, інтерферонів, інтерлейкінів та інших біоактивних речовин.

Підсумовуючи вище сказане відзначимо, що методи молекулярної біотехнології завдяки використанню ампліфікованих за допомогою ПЛР генів особливо небезпечних збудників інфекційних захворювань виключають необхідність накопичення останніх у промислових об'ємах, тим самим убезпечують персонал, що працює в галузі біопромисловості, та здоров'я споживача.

2. Нуклеїнові кислоти: структура та функції

Нуклеїнові кислоти (від лат. *nucleus* – ядро) – це високомолекулярні біополімерні сполуки, що складаються із нуклеотидних залишків, послідовність яких забезпечує збереження інформації про окремий живий організм, визначає шляхи та особливості його росту, розвитку, розмноження та передачі спадкової інформації між поколіннями. Існує два типи нуклеїнових кислот – дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) та рибонуклеїнова кислота (РНК).

Вперше нуклеїнові кислоти були виділені в 1847 р. з м'язів жуйних та названі «інозиною кислотою». У 1868 р. Ф. Мішер описав «нуклеїн», речовину з кислотними властивостями, що не піддавалася протеолізу та містила фосфор, яку дослідник виділив з тканин тваринного походження. Пізніше ця речовина була ототожнена за властивостями з хроматином, ізольованим з ядра еукаріотичних клітин.

Значних успіхів у вивченні особливостей нуклеїнових кислот було досягнуто завдяки їх фосфатазному гідролізу, який дозволив виявити чотири різновиди нуклеотидів, що формують полімерні ланцюги нуклеїнових кислот. Ці роботи проведені під керівництвом та за підтримки професора О. Годда у Кембриджському університеті.

У 1949–1951 рр. були сформульовані принципи нуклеотидного складу та співвідношення його в нуклеїнових кислотах, які отримали назву правил Чаргаффа. Зазначені правила стали основою для революційного відкриття просторової конфігурації ДНК Дж. Уотсоном і Ф. Криком у 1953 р.

Хімічні властивості та будова нуклеїнових кислот. Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот визначають їх функціональні особливості та зумовлюють базові правила роботи з ними. На них ґрунтуються принципи пробопідготовки та проведення аналізу в практиці молекулярної діагностики у гуманній та ветеринарній медицині.

Нуклеїнові кислоти добре розчинні у водному та водно-буферному середовищах, на чому базуються процеси їх екстракції та елюювання з біосубстратів при проведенні лабораторних досліджень. Нуклеїнові кислоти термолабільні, критичний вплив на них справляють високі та низькі показники рН, а також вони чутливі до дії механічних чинників. ДНК при цьому проявляє більшу стійкість у порівнянні з РНК, оскільки перша має вторинну конфігурацію (спірально). Нуклеїнові кислоти характеризуються слабким електричним зарядом. Ця властивість дозволяє проводити їх ізолювання шляхом іонної взаємодії з різноплановими сорбентними системами. Нуклеїнові кислоти також преципітуються етиловим і метиловим спиртами, майже нерозчинні в органічних розчинниках. Ферментація нуклеїнових кислот може проходити під впливом нуклеаз. Ця особливість дозволяє проводити або повне руйнування макромолекул гідролізом за участі РНКаз та ДНКаз, або цільове розщеплення полімерних молекул та їх фрагментів у визначених локусах з використанням ендонуклеаз (рестриктаз) - внутрішньоядерних ферментів, які забезпечують розрив ланцюга полінуклеотидів у певних послідовностях.

Полімерні форми нуклеїнових кислот (полінуклеотиди) являють собою ланцюги нуклеотидів поєднаних через фосфодієфірні зв'язки.

Нуклеотиди є складними ефірами фосфорної кислоти та нуклеозидів. Нуклеозиди являють собою N-глікозиди, що вміщують гетероциклічний пуриновий або піримідиновий фрагмент, поєднаний з п'ятиатомним вуглеводом – рибозою чи дезоксирибозою.

У зв'язку з цим розрізняють два типи нуклеїнових кислот – рибонуклеїнову та дезоксирибонуклеїнову, що являють собою полірибонуклеотиди та полідезоксирибонуклеотиди.

Таким чином, мономерні компоненти нуклеїнових кислот складаються з трьох компонентів: залишку фосфорної кислоти, моносахаридного залишку, а також азотистої основи. Пуринові азотисті основи включають аденін і гуанін, а піримідинові – тимін (у РНК – урацил) та цитозин (рис. 1).

Поєднання азотистих основ і пентоз – нуклеозиди – у залежності від складу прийнято називати аденозин, гуанозин, уродин, тимідин і цитидин.

Для позначення нуклеотидів і нуклеїнових основ застосовуються однобуквені символи – А (аденін), Т (тимін), С (цитозин), G (гуанін) та U (урацил). У ряді випадків перед дослідником стоїть завдання позначення змінних або так званих вироджених нуклеотидних позицій. З цією метою був розроблений однобуквений код нуклеотидних замінів (табл. 1), що був схвалений Міжнародним союзом теоретичної та прикладної хімії (IUPAC) та Міжнародним союзом біохімії та молекулярної біології (IUBMB).

Формуючи структуру ДНК або РНК нуклеотиди полімеризуються через залишки фосфорної кислоти, внаслідок чого утворюються їх полімери. Полімери з двох компонентів називають дінуклеотидами, трьох – тринуклеотидами, ланцюги з невеликої кількості нуклеотидів іменують олігонуклеотидами, а з багатьох – полінуклеотидами або нуклеїновими кислотами. Довжина нуклеїнових кислот визначається кількістю нуклеотидних залишків, що входять до її послідовності, та виражається в парах нуклеотидів (п.н.), парах основ (п.о., base pairs, bp) або нуклеотидних залишках (н.з.). У разі наявності в послідовності ДНК або РНК кількох тисяч н.з. їх позначають як тис. п.н. або тис. н.з., а якщо мова йде про геноми бактерій та еукаріот, де кількість нуклеотидів у послідовності обчислюється мільйонами їх позначають млн. п.н., або млн. н.з.

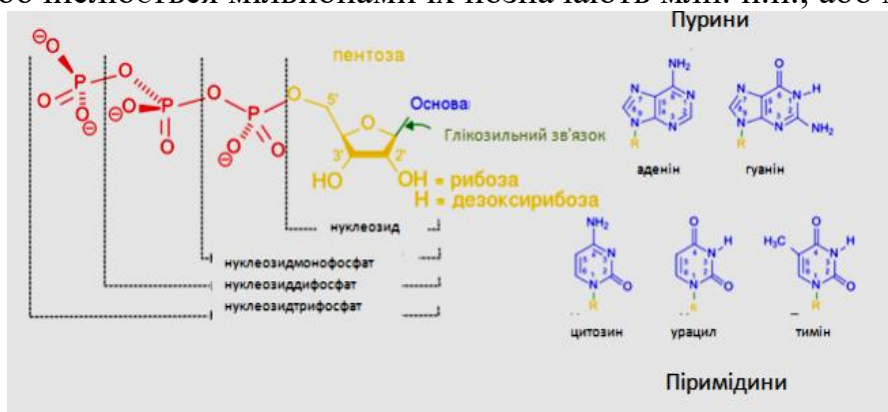


Рис. 1. Нуклеозидфосфати та азотисті основи, що входять до складу ДНК-та РНК-полімерів.

Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) є одним з двох різновидів нуклеїнових кислот, який являє собою полімер дезоксирибонуклеотидів цитозину, гуаніну, тиміну та аденіну, котрий здебільшого знаходиться у вигляді двох взаємокомплементарних антипаралельних ланцюгів.

Основною функцією ДНК є зберігання інформації про структуру РНК та білків живих організмів.

У клітинах еукаріот, тобто рослин, тварин і грибів ДНК представлена у вигляді двоспиральних полімерних макромолекул, які у складі хромосом знаходяться в ядрі клітини, а також містяться в мітохондріях у тварин і пластидах рослин. У клітинах бактерій ДНК знаходиться у вигляді кільцевих або лінійних молекул, що також також іменуються бактерійною хромосоною, а також дрібніших кільцевих молекул - плазмід. Плазмідна частина геному прокаріот, на відміну від так званих бактерійних хромосом, є лабільною. Плазмідні профілі, тобто сукупні плазмідні набори клітин бактерій можуть змінюватись при пасажуванні на різних поживних середовищах, а також при потрапленні до різних біологічних господарів. При цьому зміни проходять за рахунок обміну плазмідами між бактеріями одного виду у межах мікропопуляції.

Деяко іншим чином виглядає морфологія та організація ДНК у вірусів. Їм властиві різні типи ДНК. Так, вона може бути дволанцюговою незамкненою (аденовіруси, асфавіруси, герпесвіруси, поксвіруси, провіруси ретровірусів), замкненою (іридовіруси, паповавіруси) або одноланцюговою замкненою (цирковіруси) чи незамкненою (парвовіруси).

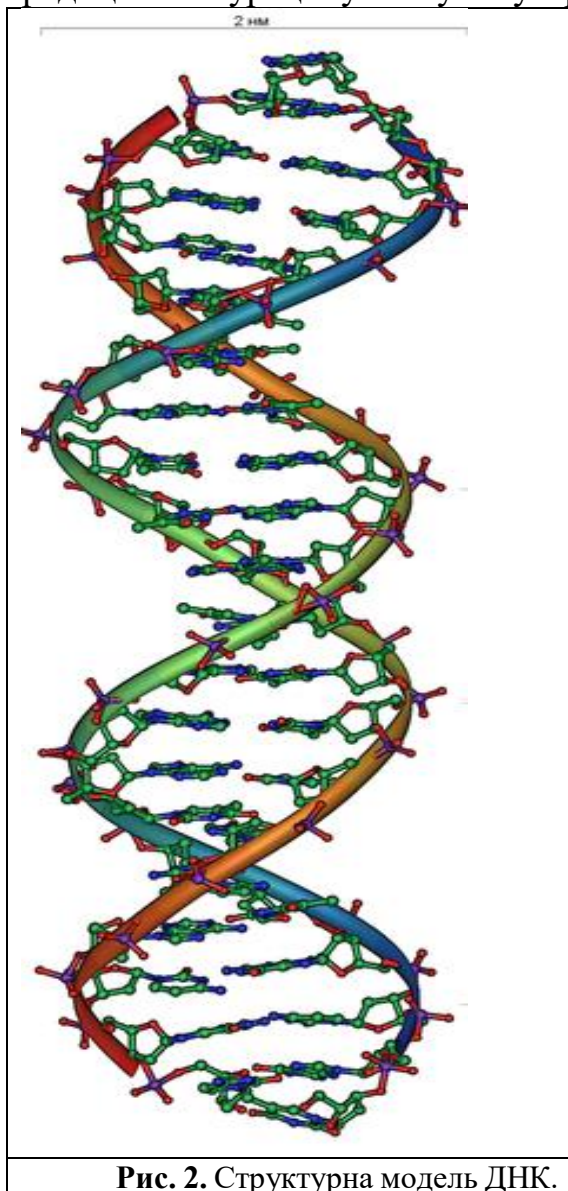
Таблиця 1

Однобуквені позначення нуклеотидів (стабільних і вироджених позицій)

Буквені коди для позначення нуклеотидів		
код	значення	комплементарна пара
A	A	T в ДНК та U в РНК
C	C	G
G	G	C
T або U	T у ДНК або U в РНК	A
M	A або C	K
R	A або G	Y
W	A або T	W
S	C або G	S
Y	C або T	R
K	G або T	M
V	A, C або G	B
H	A, C або T	D
D	A, G або T	H
B	C, G або T	V
X або N	A, C, G або T (U)	будь-який

Послідовність нуклеотидів ДНК кодує інформацію про різні типи РНК, що містяться в клітинах (інформаційні, транспортні та рибосомальні). Означені речовини за принципом комплементарності утворюються на ДНК-матрицях у процесі транскрипції.

Як відзначалося вище, ДНК у більшості живих організмів організована за принципом подвійної спіралі (рис. 2), що складається з направлених у внутрішній бік азотистими основами полінуклеонидних ланцюгів, об'єднаних за принципом комплементарності: піримідинова основа завжди знаходиться напроти пуринової. У подвійних ДНК-ланцюгах розрізняють так званий кодуєчий (смысловий, +-) ланцюг та некодуєчий (анти смысловий, --) ланцюг. При цьому гуанідинова основа завжди відповідає цитидиновій, а аденінова – тимідиновій. Азотисті основи нуклеотидів комплементарних ланцюгів з'єднані водневими зв'язками. У молекулі ж РНК, комплементарній смысловому ланцюгові ДНК замість тимінів містяться урацилові основи, або мінорні основи – метилурацил та інші. Вміст урацилу виявлений у ДНК деяких видів бактеріофагів. У той же час, у ряді типів РНК (тРНК та рРНК) замість традиційного урацилу можуть зустрічатись тимідинові основи.



Окрім кодуєчих послідовностей, які відповідають послідовності РНК, склад РНК-молекул ДНК містить регуляторні та структурні послідовності. Крім них, у геномному апараті еукаріот є також нестабільні ділянки послідовностей ДНК – транспозони. Розміри ДНК можуть значно варіювати, що особливо стосується показника їх розміру, тобто довжини. Стосовно елементів подвійної спіралі ці показники більш стабільні: її ширина складає 2,2–2,4 нм, а її елементам (малій та великій борознах спіралі) властиві розміри 1,2 та 2,4 нм, відповідно. Послідовності ДНК є комплементарними, що зумовлює тотожність інформації кодованої ними на обох ланцюгах. Принципи комплементарності та тотожності забезпечують ефективну реплікацію ДНК та виконання її основних функцій.

Нековалентні зв'язки між ланцюгами ДНК є дуже нестійкими, що зумовлює їх можливість до швидкого руйнування та такого ж швидкого відновлення. Процеси деструкції можуть відбуватися під впливом деяких ферментів, або за дії високої температури.

При цьому різні нуклеотидні пари мають різну енергію зв'язків, що обумовлює їх різну стійкість. Зокрема АТ-пари мають два водневі зв'язки, а GC-пари – три, що зумовлює необхідність підвищення енергії їх розриву. Під впливом високої температури та деяких інших фізичних факторів відбувається руйнування подвійної спіралі, що призводить до утворення двох окремих ланцюгів. Цей процес називається денатурацією або деградацією. Він може мати зворотний та незворотний характер, що є критичним при підготовці матеріалу для генодіагностики.

Вміст тих чи інших азотистих основ зумовлює показники температури плавлення ДНК, зокрема вміст ТА-пар знижує їх, у той час, високий GC-вміст навпаки збільшує цей показник. Це пояснює високий вміст ТА-пар в ділянках ДНК, що повинні бути легкоплавкими, які задіяні в процесах реплікації. Прикладом таких локусів є ТАТА-бокси промотерних областей бактерійних клітин, АТG-кодони відкритих рамок зчитування тощо.

Досліджуючи нуклеотидний склад ДНК різного походження, Чаргафф знайшов наступні закономірності, які дістали назву правил Чаргаффа:

1. Усі ДНК незалежно від їхнього походження містять однакову кількість пуринових і піримідинових основ. Отже, у будь-якій ДНК на кожний пуриновий нуклеотид доводиться один піримідиновий.

2. Будь-яка ДНК завжди містить у рівних кількостях попарно аденін і тимін, гуанін і цитозин, що звичайно позначають як $A=T$ та $G=C$. З цих закономірностей випливає третя.

3. Кількість основ, що містять аміногрупи в положенні 4 піримідинового ядра та 6 пуринового (цитозин і аденін), дорівнює кількості основ, що містять оксо-групу в тих же положеннях (гуанін і тимін), тобто $A+C=G+T$.

Також було встановлено, що для кожного типу ДНК сумарний вміст гуаніну та цитозину не дорівнює сумарному вмісту аденіну та тиміну, тобто $(G+C)/(A+T)$, як правило, відрізняється від одиниці (може бути як більше, так і менше). За цією ознакою розрізняють два основних типи ДНК: А-Т-тип, з переважним вмістом аденіну та тиміну, і G-C-тип, з переважним вмістом гуаніну та цитозину.

Показник співвідношення вмісту суми гуаніну та цитозину до суми вмісту аденіну та тиміну, що характеризує нуклеотидний склад даного виду ДНК, прийнято називати коефіцієнтом специфічності. Кожна ДНК має характерний коефіцієнт специфічності, що може варіювати від 0,3 до 2,8. При підрахунку коефіцієнту специфічності враховується вміст мінорних основ, а також заміни базових основ їхніми похідними.

У молекулі ДНК за допомогою біологічного коду зашифровано послідовність амінокислот у пептидах. Кожна амінокислота кодується сполученням трьох нуклеотидів, у цьому випадку утворюється 64 триплети, з яких 61 кодує амінокислоти, а 3 є антисмисловими і виконують функцію розділових знаків (АТТ, АСТ, АТС). Шифрування однієї амінокислоти декількома триплетами одержало назву як виродженість триплетного коду. Важливими властивостями генетичного коду є його специфічність (кожен триплет здатний кодувати тільки одну амінокислоту), універсальність (свідчить

про єдність походження всіх живих істот на Землі) і неперекриваємість кодонів при зчитуванні.

В організмі ДНК виконує наступні функції: 1) Збереження спадкової інформації. Ця функція забезпечується роботою гистонів. Молекула ДНК згортається, утворюючи спочатку нуклеосому, а після гетерохроматин, з якого складаються хромосоми; 2) Передача спадкового матеріалу, яка відбувається шляхом реплікації ДНК; 3) Реалізація спадкової інформації в процесі синтезу білка.

Послідовність ДНК-молекул та їх функціональні особливості визначають основну роль цих біополімерів у переносі спадковості та в мінливості живих організмів. Спадковість у живих організмів тісно пов'язана з процесом реплікації ДНК, у ході якого утворюються дві ідентичні копії вихідної молекули з повним набором генів, а, отже, і ознак попереднього покоління. Збереження спадкової інформації підтримується в процесі реплікації ДНК. Реплікація - це процес подвоєння молекули ДНК, який відбувається під контролем ферментів.

Під час реплікації молекули ДНК водневі зв'язки між комплементарними азотистими основами (аденином - тиміном і гуаніном - цитозином) рвуться за допомогою спеціального ферменту - хелікази, і ланцюги розходяться.

Після розриву водневих зв'язків, за участю ферменту ДНК-полімерази на кожному з ланцюгів синтезується новий («дочірній») ланцюг ДНК (до кожного нуклеотиду ниток ДНК, що розійшлися фермент ДНК-полімераза підлаштовує комплементарний йому нуклеотид). Матеріалом для синтезу служать вільні нуклеотиди, наявні у цитоплазмі клітин. У результаті процесу реплікації ДНК утворюються дві дволанцюгові молекули ДНК, до складу кожної входить один ланцюг «материнської» молекули і один «дочірній» ланцюг. Ці дві молекули є абсолютно ідентичними, і кожна дочірня клітина в результаті поділу отримує копію материнської ДНК.

Етапи процесу реплікації ДНК: 1. Спочатку молекула ДНК «розшнуровується» - ланцюги молекули розплітаються і розходяться (кожен з двох ланцюгів буде служити своєю матрицею, на якій буде синтезуватися новий ланцюг). 2. Фермент ДНК-полімераза «прикріплює» нові нуклеотиди до матриці за принципом комплементарності (до аденіну — тимін, до цитозину — гуанін, і навпаки). Після закінчення процесу, нові дочірні (сестринські) молекули розходяться і скручуються у спіралі.

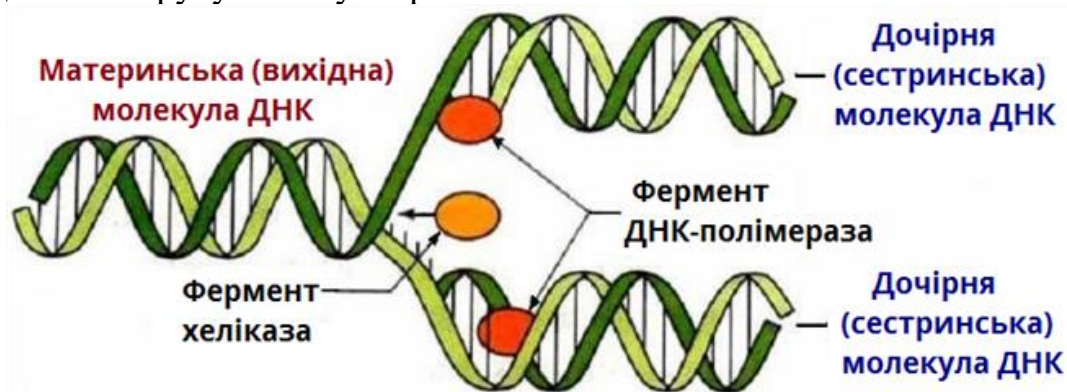


Рис. 3. Реплікація ДНК [https://miyklas.com.ua/p/biologiya/9-klas/khimichnikh-sklad-klitin-328110/nukleyinovi-kisloti-328864/re-6b577c46-495c-45ee-8371-cf78661a94df]

Генетична інформація, кодована ДНК-послідовністю реалізується за рахунок процесу експресії генів, який полягає в утворенні на ДНК-матриці інформаційних РНК (цей процес називається транскрипцією) та синтезу білкових молекул за рахунок полімеризації амінокислот на іРНК-матриці в процесі трансляції.

Транскрипція (лат. *transcriptio* — переписування) — передавання інформації між різними видами нуклеїнових кислот, перша стадія реалізації генетичної інформації в клітині. Розрізняють пряму транскрипцію (передавання інформації від ДНК до РНК шляхом утворення РНК) і зворотну (передавання інформації від РНК з утворенням компліментарної ДНК). У клітинах еукаріотів і більшості прокариотів відбувається пряма транскрипція.

Зворотна транскрипція притаманна вірусам. Вперше цей процес був виявлений та описаний у РНК-вміщуючих онкогенних вірусів. Він був індукований ферментом РНК-залежною ДНК-полімеразою (звратною транскриптазою, або ревертазою) з утворенням ДНК-копії.

У інших РНК-вміщуючих вірусах (SARS-CoVi-2, грипу, кору, поліовірусу та інших) інформація передається від РНК до РНК. На відміну від реплікації, при транскрипції відбувається копіювання молекули ДНК не по всій довжині, а лише в її окремих фрагментах — генах або їх групах.

ДНК вміщує сигнальні нуклеотидні послідовності, які вказують на початок та кінець ділянок молекули, що підлягають транскрипції. Ці ділянки іменуються промоторними (стартовими) та термінальними (кінцевими) послідовностями. Гени в структурі молекул ДНК кодують інформацію про структуру всіх типів РНК і всіх білків даного виду організму.

У ході транскрипції утворюються молекули матричної РНК (мРНК), які є матрицею для синтезу білків, а також транспортної РНК (тРНК), рибосомної РНК (рРНК) та інші види молекул РНК. Основою механізму транскрипції, рівно як і при реплікації, слугує принцип комплементарності основ.

Послідовність рибонуклеотидів у ланцюгу РНК є комплементарною послідовності дезоксирибонуклеотидів одного із ланцюгів ДНК, який виконує роль матричного. У дволанцюговій ДНК, що вміщує багато генів, для одних генів ДНК матричним може бути один ланцюг, для інших генів — другий ланцюг. У геномі еукаріотів процес транскрипції відбувається в ядрі. Синтез молекул РНК починається у певних послідовностях (сайтах) ДНК — промоторах і завершується в сайтах термінації. Ділянка ДНК, обмежена промотором і сайтом термінації, являє собою одиницю транскрипції, тобто зону транскрипції, яка називається транскриптоном.

У прокариотів після промотору розташована регуляторна ділянка — оператор, яка взаємодіє з білками — регуляторами транскрипції. У еукаріотів її функцію виконує акцепторна зона. У середині транскриптон (перед сайтом термінації) знаходяться структурні гени або цистрони.

У клітинах прокариот первинний транскрипт часто містить РНК-копії одразу кількох генів, а в еукаріотів, як правило, — лише одиничного гена. Натомість у еукаріотів кожний транскриптон вміщує неінформативну зону, з

якою взаємодіють регуляторні транскрипційні фактори. Неінформативна частина в транскриптоні еукаріот становить до 90%, а у прокариотів — лише 10%.

Біосинтез РНК здійснюється ДНК-залежними РНК-полімеразами. У прокариотів існує тільки одна РНК-полімераза, яка каталізує синтез усіх трьох головних типів РНК, а в ядрах еукаріотів виявлені три РНК-полімерази: РНК-полімераза I, що синтезує попередник рРНК — пре-рРНК; РНК-полімераза II, відповідальна за синтез пре-мРНК; РНК-полімераза III, що синтезує пре-тРНК і пре-5SRНК. РНК-полімерази складаються із декількох субодиниць — 2α , β , β' , що утворюють так званий кор-фермент, і σ -субодиниці, яка виконує регуляторну функцію і є одним із факторів ініціації транскрипції.

РНК-полімерази I, II, III, які розпізнають різні промотори, містять різні за структурою субодиниці σ . Для забезпечення процесу транскрипції необхідні ДНК-матриця, фермент ДНК-залежна РНК-полімераза, 4 рибонуклеозидтрифосфати (АТФ, ГТФ, УТФ і ЦТФ) як попередники нуклеотидних елементів РНК, іони Mg^{2+} , а також білкові фактори транскрипції, які прискорюють або уповільнюють процес.

Транскрипція включає три стадії: ініціацію, елонгацію і термінацію. На першій стадії відбувається зв'язування РНК-полімерази з промотором ДНК-матриці за участю S -субодиниці ферменту, яка в подальшому дисоціює від кор-ферменту. Взаємодію РНК-полімерази з промотором полегшує ТАТА-фактор, який взаємодіє зі специфічною послідовністю нуклеотидів промотору — ТАТААА-(ТАТА-бокс). Останній змінює конформацію РНК-полімерази і забезпечує розкручування приблизно одного витка спіралі ДНК з утворенням транскрипційної вилки, в якій матричний ланцюг стає доступним для початку синтезу ланцюга РНК.

Синтез РНК починається із включення в ланцюг першого з 5'-кінця нуклеотиду, яким у молекул РНК є АТФ або ГТФ. Після того як був синтезований олігонуклеотид із 8–10 нуклеотидних залишків, σ -субодиниця відділяється від РНК-полімерази, а замість неї до молекули ферменту приєднуються декілька факторів елонгації й починається наступна стадія. Синтез молекули РНК відбувається в напрямку 5'→3' антипаралельно матричному ланцюгу ДНК.

У процесі елонгації (подовження полінуклеотидного ланцюга) РНК-полімераза пересувається вздовж матричної молекули ДНК і комплементарно їй послідовно приєднує нуклеотиди за допомогою фосфодієфірних зв'язків з утворенням зростаючого ланцюга РНК. Азотисті основи А, Г, Т, Ц ланцюга ДНК кодують включення в ланцюг, відповідно, основ У, Ц, А і Г.

Внаслідок елонгації утворюється ДНК-РНК-гібрид, що складається з матричного ланцюга ДНК та РНК-транскрипту.

Термінація процесу настає після досягнення РНК полімеразою сайтів термінації (стоп-сигналу). Вважають, що такими стоп-сигналами в транскриптоні є полі-(А)-послідовності, тому в ланцюгу РНК на 3'-кінці знаходяться комплементарні їм полі-(У)-послідовності. Цей сигнал розпізнається термінуючим білком — ρ -фактором. Взаємодія ρ -фактора з полімеразним комплексом приводить до дисоціації комплексу ДНК-фермент-

РНК і вивільнення синтезованого ланцюга. Первинні транскрипти РНК або пре-РНК, що утворилися, є комплементарними копіями транскриптонів ДНК і містять як інформативні (екзони), так і неінформативні (інтрони) ділянки. Молекули пре-РНК піддаються далі посттранскрипційним змінам (процесингу), які містять ковалентні модифікації 3'- і 5'-кінців, вирізання інтронів, сплайсинг (зшивання) екзонів, нуклеозидні модифікації, внаслідок чого формуються зрілі функціональні молекули РНК.

Трансляція (лат. *translatio* — передача, переміщення) — процес біосинтезу білка, тобто другий етап реалізації генетичної інформації, який полягає в переведенні нуклеотидної послідовності матричної РНК (мРНК) в амінокислотну послідовність білка. У такий спосіб ніби відбувається переклад інформації з «мови» нуклеотидної послідовності мРНК на «мову» амінокислотної послідовності білка.

Оскільки з 4 видів нуклеотидів можна отримати 64 різних комбінації по 3 нуклеотиди, було зроблено висновок про існування щонайменше 64 «кодових слів» для 20 амінокислот. Такий спосіб записування генетичної інформації одержав назву генетичного коду. Було встановлено, що з 64 комбінацій нуклеотидів 61 кодон є змістовним (визначає включення до складу білка певної амінокислоти), а 3 кодони — беззмістовні (не кодують жодної з амінокислот). Їх іменують нонсенс-кодони: УАА, УАГ, УГА. Роль цих ділянок полягає у термінації процесу трансляції, для чого вони слугують сигналом.

Нуклеотидна послідовність молекули мРНК містить кодони для кожної амінокислоти. Адапторами транслуючих послідовностей кодонів в амінокислотну послідовність білка є молекули транспортних РНК (тРНК), що визначається їх структурою. У складі молекул тРНК є 3'-кінець, що зв'язується з амінокислотою, і антикодон — ділянка з 3 нуклеотидів, яка розпізнає в мРНК триплет, що кодує цю амінокислоту.

Передача інформації під час трансляції здійснюється за матричним механізмом, і роль безпосередньої матриці при цьому виконує молекула мРНК. У молекулі мРНК містяться триплети (кодони), у нуклеотидній послідовності яких закодована інформація про первинну структуру поліпептидного ланцюга, одержана мРНК від ДНК при транскрипції.

Процес синтезу білка є найбільш складним з-поміж біосинтетичних процесів. У еукаріотичних клітинах у ньому беруть участь понад 70 різних білків, а також не менше 20 ферментів, необхідних для активації амінокислот, більше 10 білкових факторів ініціації, елонгації й термінації синтезу поліпептидних ланцюгів, та близько 100 додаткових ферментів, які беруть участь у посттрансляційних модифікаціях білків (рефолдингу та інших), понад 70 видів транспортних і рибосомних РНК (рРНК).

Синтез білка відбувається в декілька основних етапів. Першим етапом є активація й відбір амінокислот. В цитозолі клітин кожна з 20 амінокислот ковалентно приєднується до відповідної тРНК за допомогою ферменту аміноацил-тРНК-синтетази з утворенням аміноацил-тРНК.

Після активації молекули аміноацил-тРНК дифундують до рибосом, на яких проходить біосинтез білка. У процесі трансляції розрізняють 3 основні

етапи: ініціацію (початок синтезу поліпептидного ланцюга), елонгацію (його подовження) і термінацію (завершення синтезу).

Для ініціації синтезу білка в еукаріотів необхідна наявність 40S- та 60S- субодиниць рибосоми, мРНК, факторів ініціації, ініціюючої аміноацил-тРНК, а також ГТФ і АТФ в якості джерел енергії.

У процесі ініціації відбувається утворення ініціюючого комплексу. На цьому етапі 40S-субодиниця рибосоми з'єднується з фактором ініціації. Потім цей ще складніший комплекс зв'язується з 5'-кінцем мРНК за участю декількох eIF. Після приєднання до мРНК, 40S-субодиниця пересувається по некодуєчій частині мРНК, доки не досягне ініціюючого кодону АУГ, який відповідає ініціюючій амінокислоті метіоніну. Цей процес супроводжується гідролізом АТФ і вивільненням енергії.

Після досягнення початку кодуєчої послідовності мРНК, 40S-субодиниця зупиняється і зв'язується з іншими факторами ініціації, які прискорюють приєднання 60S-субодиниці й утворення 80S рибосоми за рахунок енергії внаслідок гідролізу ГТФ.

При цьому формуються А- і Р-центри рибосоми; у Р-центрі знаходиться АУГ-кодон мРНК, до якого приєднана мет-тРНК, а в А-центрі — триплет, який кодує включення другої амінокислоти до білка, що синтезується. Далі починається найтриваліший етап білкового синтезу — елонгація. На цьому етапі поліпептидний ланцюг подовжується за рахунок послідовного ковалентного приєднання амінокислот, кожна з яких доставляється до рибосоми і вбудовується в певне положення за допомогою відповідної тРНК, яка утворює комплементарні пари з відповідним їй кодоном у мРНК.

Включення амінокислоти в білок відбувається шляхом зв'язування аміноацил-тРНК кожної амінокислоти, що входить до білка з А-центром рибосоми, потім - транспептидації, коли спочатку метіонін, а далі пептид, які знаходяться в Р-центрі, приєднуються до α -NH₂-групи аміноацильного залишку аміноацил-тРНК А-центру з утворенням пептидного зв'язку.

Третя стадія елонгації — транслокація. При цьому подовжена на один амінокислотний залишок пептидил-тРНК переміщується із А-центру в Р-центр унаслідок транслокації рибосоми. Елонгація забезпечується специфічними факторами за підтримки енергії ГТФ.

Термінація трансляції відбувається, коли транслуюча рибосома у своєму переміщенні впродовж ланцюга мРНК досягає одного з термінуючих кодонів (нонсенс-кодонів), які є сигналами для закінчення синтезу поліпептидного ланцюга. Вони розпізнаються факторами термінації, які каталізують гідролітичне відщеплення синтезованого поліпептиду від кінцевої тРНК, звільнення його та кінцевої тРНК і мРНК від рибосоми, дисоціацію рибосоми на субодиниці. Майже завжди мРНК транслюється одночасно багатьма рибосомами. Така структура називається полірибосомою (полісомою). Поліпептидний ланцюг набуває своїх біологічних властивостей після утворення унікальної просторової конформації білкової молекули, тому в багатьох випадках передує його посттрансляційна модифікація.

Отже, ДНК виконує в організмі функції збереження спадкової інформації за рахунок унікальності кодуєчих послідовностей, її передачі через процеси реплікації та реалізацію через синтез білкових молекул.

Рибонуклеїнова кислота (РНК) – це клас нуклеїнових кислот, лінійних полімерів нуклеотидів, до складу яких входять залишок фосфорної кислоти, рибоза (на відміну від ДНК, що містить дезоксирибозу) і азотисті основи — аденін, цитозин, гуанін і урацил (на відміну від ДНК, що замість урацила містить тимін).

Рибонуклеїнова кислота — одна з трьох основних макромолекул (дві інші ДНК та білки), яка відіграє важливу роль в кодуванні, зчитуванні, регулюванні генів та реалізації генетичної інформації. Так само як ДНК, РНК складається з ланцюжка нуклеотидів. Кожен нуклеотид складається з азотистої основи, цукру рибози та фосфатної групи. Послідовність нуклеотидів дозволяє РНК кодувати генетичну інформацію. Всі клітинні організми (еукаріоти) використовують РНК (мРНК) для синтезу білків у якості матриці.

Клітинні РНК утворюються під час транскрипції, тобто синтезу РНК на матриці ДНК. Матричні РНК (мРНК) беруть участь в процесі, який називається трансляцією. Трансляція — це синтез білку на матриці мРНК за участі рибосом. Інші РНК після транскрипції піддаються хімічним модифікаціям, і, після утворення вторинних і третинних структур, виконують функції залежно від типу РНК.

Деякі РНК беруть участь в синтезі білка клітини, зокрема, транспортні РНК (тРНК) слугують для розпізнання кодонів і доставки відповідних амінокислот до місця синтезу протеїнів, а рибосомні РНК слугують структурною і каталітичною основою функціонування рибосом клітини.

Малі ядерні РНК беруть участь в сплайсингу еукаріотичних матричних РНК та інших процесах. РНК входять до складу деяких ферментів (наприклад теломерази), в окремих РНК виявлена власна ферментативна активність, їх називають рибозимами.

РНК синтезуються в клітинах всіх живих організмів, а також містяться у віроїдах та деяких вірусах. Основні функції РНК в клітинах макроорганізмів залежать від типу РНК. Кодуючі РНК є матрицею для трансляції генетичної інформації в білки, некуючі РНК виконують додаткові функції, такі як транспорт амінокислот до рибосом, регуляція експресії генів тощо. РНК вірусів може бути носієм генетичної інформації, замість ДНК. Віроїди складаються з кільцевої молекули РНК та не містять в собі інших молекул.

Рибонуклеїнові кислоти як і інші нуклеїнові кислоти складаються з нуклеотидів — складних хімічних сполук, що утворені з моносахариду, азотистої основи пурину чи піримідину, залишків фосфорної кислоти. Моносахаридом в усіх РНК є рибоза.

Основними нуклеозидами в природних біологічних полімерних РНК є аденозин, гуанозин, цитидин, а також уридин (на відміну від ДНК, де замість останнього присутній тимідин).

У клітинах поширені мономери рибонуклеїнової кислоти — рибонуклеотиди. Вони використовуються, як будівельний матеріал для синтезу полімерних РНК.

Полімерні молекули РНК переважно одноланцюгові, але в клітинах трапляються й дволанцюгові РНК: як вірусного походження, так і внутрішньоклітинного (мікроРНК, піРНК тощо).

Азотисті основи у складі РНК можуть утворювати водневі зв'язки між нуклеотидами.

Між ДНК та РНК існують три основні відмінності. ДНК вміщує вуглевод дезоксирибозу, РНК — рибозу, у якої є додаткова, порівняно з дезоксирибозою, гідроксильна група. Ця група збільшує ймовірність гідролізу молекули, тобто зменшує стабільність молекули РНК.

Азотиста основа, компліментарна аденіну, у РНК не тимін, як у ДНК, а урацил — неметильована форма тиміну. ДНК існує у формі подвійної спіралі, що складається з двох окремих молекул, у той час, як молекули РНК набагато коротше і переважно мають одноланцюгову будову.

Більшість молекул РНК, наприклад, рРНК і мяРНК (малі ядерні РНК) в клітині функціонують у вигляді комплексів з білками.

У функціонуванні РНК задіяні численні ферменти. Серед них РНК-полімерази, РНК-гелікази, нуклеази, лігази тощо. Окрема група ферментів редагування РНК модифікує окремі нуклеотиди, змінюючи генетичну інформацію. У тварин це аденозиндезамінази РНК, а в хребетних ще й цитидиндезамінази РНК.

Синтез полімерної РНК здійснюється на матриці ДНК в ході транскрипції. Далі первинний транскрипт проходить модифікації: видаляються одні фрагменти (сплайсинг), додаються інші (наприклад, поліаденилювання), замінюються нуклеотиди (редагування РНК) тощо. Ці процеси називають процесингом РНК. Дозріла РНК далі транспортується до місця її функціонування.

Чимало молекул РНК після синтезу на матриці ДНК підлягають змінам, які призводять до дозрівання новосинтезованої молекули до її функціонально активної форми. Ці процеси модифікації називають процесингом

Яскравим прикладом процесингу є дозрівання пре-мРНК до зрілої мРНК, з якої в цитоплазмі відбувається зчитування інформації про амінокислотну послідовність білків (трансляція). Інтрони вирізують з про-мРНК сплайсосою, яка крім білків містить декілька малих ядерних РНК (мяРНК). Крім того, інтрони можуть каталізувати власне вирізання (аутосплайсинг). Утім, процесингу зазнають не лише мРНК, а й багато видів некодуєчих РНК, транспортна РНК та рибосомна РНК.

У сучасних клітинах РНК виконує функції, пов'язані з експресією генів та синтезом білків. Значна частина РНК задіяні в біосинтезі білків: транскрипції і трансляції генетичної інформації. Інші РНК регулюють ці процеси. Також молекули РНК беруть участь у процесах синтезу ДНК, зокрема при ініціації реплікації ДНК, подовженні теломерів, реакціях зворотної транскрипції.

У біосинтезі білків задіяні матричні, рибосомні, транспортні РНК. Матричні РНК були дослідженні першими, тому їхня роль у кодуванні генетичної послідовності амінокислот у білку протиставлена всім іншим різноманітним РНК, які отримали назву «некодуючих РНК».

Матричні рибонуклеїнові кислоти, або мРНК відповідають за перенесення інформації про первинну структуру білків від ДНК до місць синтезу білків. Матрична РНК (мРНК) синтезується на основі ДНК в ході транскрипції, після чого, у свою чергу, використовується під час трансляції як матриця для синтезу білків. Тим самим мРНК грає важливу роль в експресії генів.

Транспортні РНК, або тРНК, є відносно малими молекулами, що складаються з приблизно 80 нуклеотидів. Вони мають характерну консервативну третинну структуру. Вони переносять специфічні амінокислоти до місця синтезу пептидного зв'язку в рибосомі. Кожна тРНК містить ділянку для приєднання амінокислоти і антикодон для пізнавання та приєднання до кодону мРНК. Антикодон утворює водневі зв'язки з кодоном, що поміщає тРНК в положення, що сприяє утворенню пептидного зв'язку між останньою амінокислотою утвореного пептиду і амінокислотою, приєднаною до тРНК. Транспортні РНК приєднують певні амінокислоти в цитоплазмі і направляється до місця синтезу білка на мРНК де зв'язується з кодоном і віддає амінокислоту, яка використовується для синтезу білка.

Рибосомні РНК, або рРНК формують структуру рибосом. Еукаріотичні рибосоми містять чотири типи молекул рРНК: 18S, 5.8S, 28S і 5S. Три з чотирьох типів рРНК синтезуються в полісом. У цитоплазмі рибосомальні РНК з'єднуються з рибосомальними білками і формують нуклеопротейн, званий рибосоною. Рибосома приєднується до мРНК і синтезує білок. рРНК становить до 80 % РНК, що виявляється в цитоплазмі еукаріотичної клітини.

Незвичайний тип РНК, який діє як тРНК і мРНК (тмРНК), виявлений у багатьох бактеріях і пластидах. При зупинці рибосоми на дефектних мРНК без стоп-кодонів тмРНК приєднує невеликий пептид, що направляє білок на деградацію.

Низка малих дволанцюгових РНК виконують важливі функції з регуляції експресії генів. Зв'язуючись з мРНК або іншими РНК, вони призводять до їхньої деградації або принаймні зупинки трансляції. З'єднуючись з білками аргонавтами, ці молекули РНК утворюють комплекс RISC, який пригнічує трансляцію білка шляхом так званої РНК-інтерференції.

МікроРНК — це малі РНК, довжиною 21-22 нуклеотиди наявні в еукаріот, які впливають через механізм РНК-інтерференції. При цьому комплекс мікроРНК і ферментів може призводити до метилювання нуклеотидів в ДНК промотора гена, що служить сигналом для зменшення активності гена. При використанні іншого типу регуляції мРНК, комплементарна мікроРНК, деградує. Однак є й мікроРНК, які збільшують, а не зменшують експресію генів.

Малі інтерферуючі РНК, або міРНК, подібний до мікроРНК клас молекул, довжиною 20—25 нуклеотидів. Часто утворюються в результаті розщеплення вірусних РНК, але існують і ендогенні клітинні міРНК. Малі інтерферуючі РНК також діють через РНК-інтерференцію за схожими з мікроРНК механізмами.

Малі інтерференційні РНК. Найбільша активність піРНК спостерігається в період ембріонального розвитку організмів, коли вони заглушують активність транспозонів.

Малі шпилькові РНК є штучними аналогами міРНК, розробленими з метою експериментального чи терапевтичного пригнічення експресії певних генів. Зазвичай вони є специфічними до певної послідовності та блокують трансляцію лише одного конкретного гену.

Молекули РНК присутні в більшості біологічних процесів. Це дало підстави думати про те, що на ранніх етапах біохімічної еволюції саме РНК була основним носієм генетичної інформації.

У вірусів ряду родин РНК відіграє роль носія генетичної інформації. При цьому існують інфекційні молекули РНК, так звані віроїди, які взагалі позбавлені білкової оболонки.

У ретровірусів геном представлений РНК, але для експресії генів має утворитися компліментарна йому ДНК (ДНК-провірус, здатний до реплікації). У РНК-позитивних вірусів (наприклад коронавірусів) геном відіграє функцію матричної РНК, тоді як у РНК-негативних (наприклад віруси грипу) потрібен синтез мРНК, компліментарної до РНК-геному. Також існують дволанцюгові РНК-віруси.

РНК активно використовуються в наукових дослідженнях та у медичній сфері (шляхом розробки та створення РНК-вакцин, наприклад, РНК-вакцини проти COVID-19 виробництва Pfizer та Moderna). Для аналізу РНК виділяють з тканин, клітин та доквілля. Існує низка фізико-хімічних методів, які дозволяють очистити РНК від баластних речовин, зокрема ДНК, білків, ліпідів та вуглеводів.

3. Гени та геноми мікро- і макроорганізмів

Генетична інформація про структуру білків і нуклеїнових кислот у всіх організмів міститься в молекулах ДНК або РНК у вигляді послідовностей нуклеотидів, які називаються генами. Історично ген визначали, як одиницю спадкової інформації, тобто, як конкретно узятую ознаку визначеного генотипу або індивіду.

На сьогодні, з розвитком молекулярної біології, ген визначають як ділянку ДНК (у випадку вірусів ДНК, провірусної ДНК, або РНК), що несе цілісну інформацію про структуру однієї молекули РНК або однієї молекули протеїну, зашифровану за допомогою генетичного коду. Ці кодуючі ділянки визначають процеси росту, розвитку та функціонування живих організмів.

Сукупність генів організму, поряд з іншими послідовностями ДНК (у ряду вірусів – РНК), складає геном. Координована робота (експресія) великого числа генів можлива завдяки наявності регуляторних механізмів, що визначають місце, час і рівень експресії конкретного гена або групи генів. Щоб експресія гена була регульованою, він повинен містити індивідуальну (регуляторну) мітку, за якою регуляторні компоненти генетичної системи клітини або організму могли б безпомилково впливати на нього необхідним чином. Відповідно, будь-який ген складається з двох основних функціональних частин (послідовностей нуклеотидів) – регуляторної та структурової. Регуляторна частина забезпечує перші етапи реалізації генетичної інформації, укладеної в структуровій частині гена, тобто ініціацію (за допомогою промотору) та термінацію (за допомогою термінатору) читання при процесах транскрипції з утворенням РНК задля синтезу білків.

Класичне уявлення про ген як цистрон, а також модель Ф. Жакоба та Ж. Моно регуляції активності поліцистронних оперонів бактерій стали вершиною розвитку молекулярної генетики 60-х років. До початку 70-х рр. у відношенні структури та функціонування гена, принаймні прокариотичного, вважали, що ген являє собою безперервну послідовність нуклеотидів ДНК, яка складається з двох частин – регуляторної та структурової.

У моделі гена 60-х років регуляторна частина завжди розташована перед структуровою, що й обумовлює рівень його експресії через взаємодію з регуляторними білками. Структурова частина гена кодує єдиний поліпептидний ланцюг білка чи молекулу РНК і колінеарна білковому продукту, тобто послідовність нуклеотидів гена визначає послідовність амінокислот у кодованому цим геном білку. Модель передбачає його чіткі межі та постійну локалізацію на хромосомі. Зміни в первинній структурі гена та його переміщення в геномі могли бути тільки наслідком непередбачених мутацій і повинні були приводити до порушення його функціонування.

Існує кілька різновидів генів:

- структурові — кодують синтез білків (по суті, це гени мРНК);
- гени тРНК — кодують синтез тРНК;
- гени рРНК — кодують синтез рРНК;
- регуляторні — контролюють активність структурових генів.

На молекулярному рівні ген складається з двох структурних ділянок:

1. ДНК ділянки, з якої внаслідок транскрипції зчитується одноланцюгова РНК-копія.

2. Додаткові ДНК ділянки, які задіяні в регуляції копіювання (промотор, термінатор та енхансери).

Комбінація і послідовність цих ділянок можуть бути особливими для кожного конкретного гена, а також структура гомологічних генів у різних організмів можуть суттєво відрізнятись. Типовому гену еукаріотів передують регуляторна ДНК-ділянка — промотор, до якого приєднуються ензим РНК-полімераза та фактори транскрипції і забезпечують процес транскрипції.

Довжина гена складається з розмірів його структурової та регуляторної частин. Визначити цей параметр не так легко, особливо якщо це стосується еукаріотичних генів. Окремі елементи регуляторної області генів, наприклад, енхансери, можуть розташовуватися на значній (>60 тис. пар основ) відстані від структурної частини, перед нею, за нею чи навіть у ній самій.

Типовий транскрипт гену (пре-мРНК) містить некодуючі ділянки інтрони, які вирізаються з мРНК під час сплайсингу, і кодуєчі ділянки – екзони, які зшиваються разом у зрілу мРНК. Під сплайсингу можуть утворюватись альтернативні за зшиванням різних ділянок екзонів комбінації, що призводить до утворення різних варіантів мРНК при зчитуванні з однієї ділянки ДНК.

Відношення довжини і кількості інтронів в генах дуже різноманітне. Є гени як з одним інтроном, в той час, як існують гени, у яких інтрони складають до 95 % всієї послідовності.

Зріла мРНК містить відкриту рамку зчитування, а також некодуючі елементи: 5'-нетрансльовану ділянку, та 3'-нетрансльовану ділянку. Ці ділянки задіяні в регуляції процесу трансляції, а також регулюють активність специфічних ензимів, що руйнують мРНК – РНКаз.

Гени бактерій та інших прокариот відрізняються від генів еукаріотів тим, що не містять в своїй структурі інтронів. При цьому окремі кодуєчі ділянки можуть бути розташовані щільно одна до одної, утворюючи поліцистронний кластер, який регулюється спільним промотором.

У таких випадках цей генний кластер зчитується спільним транскриптом, але транслюється в різні білки. Така спільна генна структура називається опероном. Оперони – типові генні кластери у геномі бактерій та інших прокариотів.

Гени кодують не тільки мРНК, яка транслюється в білок, а також структурну рибосомну РНК, транспортну РНК, рибозими, мікроРНК, міРНК та піРНК, які виконують регуляторні функції. Послідовність ДНК, з якої зчитується некодуюча РНК часто називається РНК-геном.

Гени характеризуються наступними властивостями:

- дискретність – полягає в тому, що гени не змішуються;
- специфічність – кожен ген кодує свій продукт;
- стабільність – здатність зберігати свою структуру;
- лабільність – здатність до мутацій;
- експресивність – ступінь вираженості гена в ознаці;

- алельність – у генотипі диплоїдних організмів лише дві форми гена;
- множинний алелізм – багато генів існують в популяції в безлічі молекулярних форм;
- плейотропія – множинний ефект гена;
- пенетрантність – частота прояву гена в фенотипі;
- ампліфікація – здатність до примноження кількості копій гена.

У структурній частині більшості еукаріотичних генів кодуєчі нуклеотидні послідовності – екзони – перемежуються довгими послідовностями, що не кодують інформацію про білкову структуру – інтронами. Сумарний розмір інтронів, як правило, багаторазово перевищує сумарний розмір екзонів окремо взятих генів. Таким чином, геном еукаріотичного організму містить не тільки послідовність нуклеотидів з генетичною інформацією про білки і нуклеїнові кислоти, але й велику кількість послідовностей нуклеотидів, які не несуть такої інформації. Крім інтронів, у геномі еукаріот має місце велика кількість інших послідовностей нуклеотидів, тому загальна довжина послідовностей нуклеотидів у геномі еукаріот у десятки разів перевищує довжину кодуєчих послідовностей. Не цілком визначені й дуже великі розміри генів еукаріот, до того ж розташовані у геномі серед численних послідовностей, що не кодують нуклеотиди, а створюють значні труднощі для вивчення їхньої структури та функціонування *in vivo*.

Більшість генів еукаріот має мозаїчну структуру послідовностей нуклеотидів, що кодують і не кодують, – екзонів та інтронів. Лише в результаті сплайсинга попередників мРНК заключені в них інтрони вирізають та відновлюється колінеарність гена, мРНК та білкового продукту.

Видалення надлишкових послідовностей у результаті сплайсинга відбувається не тільки на рівні РНК, але й на рівні поліпептидних ланцюгів.

Редагування кодуєчих частин РНК на посттранскрипційному рівні має велике розповсюдження у тварин, рослин і мікроорганізмів.

Та сама послідовність нуклеотидів ДНК може кодувати різні поліпептидні ланцюги. Генетичний матеріал багатьох вірусів і бактеріофагів організований компактно. Наприклад, на визначених ділянках геному коліфагу f2 або бактеріофагу фХ174 для кодування білка використовуються дві можливі рамки зчитування. Унікальне надкомпактне кодування генетичної інформації властиве мобільному генетичному елементу бактерій IS5, у якого один з ланцюгів ДНК містить два гени, що перекриваються, а комплементарна їм ділянка іншого ланцюга укладає в собі третій ген.

У таких випадках можна говорити про наявність у самій тій послідовності нуклеотидів декількох генів у класичному значенні цього слова.

Кодування різних поліпептидів однією і тією ж послідовністю нуклеотидів ДНК має місце і для еукаріот, і для вірусів. З одного попередника мРНК у результаті альтернативного сплайсинга утворюється декілька зрілих мРНК, що кодують різні білки.

Загальна сукупність генів у організмі або клітині називається геномом. У прокаріотів переважна більшість генів, розташовані на одній хромосомі, що має вигляд кільцевої ДНК. У еукаріотів зазвичай кілька окремих лінійних спіралей

ДНК упаковані в щільні комплекси ДНК-білок, що називаються хромосомами. Гени, які розташовані на одній хромосомі в одного виду, в геномі іншого виду можуть бути розташовані на різних хромосомах.

Місце на хромосомі, де розташований ген, називається локусом. Гени не рівномірно розподілені по хромосомах, а частково згруповані в так звані кластери.

Генний кластер містить або випадкові гени, розташовані у безпосередній близькості один до одного, або групи генів, які кодують білки, що перебувають у функціональній залежності.

Гени, білки яких мають схожі функції, також можуть бути розташовані на різних хромосомах.

У клітинах багатьох біологічних видів можуть міститись декілька копій одного і того ж гену. Клітини або організми з однією копією гену на кожній хромосомі — називаються гаплоїдними; з двома копіями — диплоїдними, з більш як двома — поліплоїдними. Копії гену на парних хромосомах можуть бути не ідентичними. Під час статевого розмноження одна копія гену успадковується від одного батька, інша — від іншого.

У всіх еукаріотичних і більшості прокаріотичних організмів геном представлений ДНК. В еукаріотичних клітинах – у вигляді відповідного для даного виду числа хромосом, у бактерій та патогенних грибів – у вигляді однієї хромосоми (її довжина може складати до трьох і більше мільйонів пар нуклеотидів), а також коротких замкнених кільцеподібних ланцюгів – плазмід, довжина яких сягає до 40000 пар нуклеотидів.

Найбільше розмаїття за будовою властиве вірусним геномам. Останні можуть мати як ДНК-, так і РНК-природу. При цьому ДНК може бути як двоспіральною (герпесвіруси, поксвіруси), так і односпіральною (цирковіруси).

Довжина вірусних ДНК-геномів становить від 2 до понад 250 тис. п.н.

Генетичний матеріал РНК-вміщуючих вірусів представлений як односпіральною (пікорнавіруси, параміксовіруси), так і двоспіральною (бірнавіруси, реовіруси) молекулами. РНК деяких вірусів взагалі існує у вигляді окремих сегментів (ортоміксовіруси, реовіруси) довжиною 2000–3500 пар нуклеотидів. За кодуючими здібностями розрізняють РНК-вміщуючі віруси з позитивно-ланцюговою РНК, які можуть розмножуватись без стадії утворення ДНК-провірусу (параміксовіруси та ін.), а також з негативно ланцюговою РНК, які в організмі існують у вигляді провірусної ДНК-молекули, інтегрованої до геному (ретровіруси).

4. **Методи молекулярної діагностики в медицині та біології**

5.

Методи молекулярної діагностики у гуманній та ветеринарній медицині вражають існуючим розмаїттям. Вони засновані на виявленні молекулярних маркерів розвитку патологічних станів. Такими маркерами можуть виступати білкові молекули (антигени, медіатори імунних реакцій або антитіла) та нуклеїнові кислоти (РНК і ДНК).

Попри багатогранність молекулярно-генетичних та молекулярно-біологічних методів їх можна умовно згрупувати до певних категорій у залежності від механізму реалізації.

Щодо методів виявлення нуклеїнових кислот збудників та генетичних маркерів патологічних станів їх поділяють на:

- ампліфікаційні – методи, засновані на примноженні кількості копій нуклеїнових кислот у визачених локусах з метою їх візуалізації,
- неампліфікаційні – методи детектування нуклеїнових кислот без збільшення їх кількості (за візуалізацією з використанням гібридизаційних методів або перетравлюванням рестриктазами тощо),
- аналітичні – методи поглибленого дослідження нуклеотидних послідовностей.

Ампліфікаційні методи. Полімеразна ланцюгова реакція:

Основу сучасних ампліфікаційних методів молекулярної діагностики, епідеміології, епізоотології та більшості загально біологічних молекулярно-генетичних технік складає полімеразна ланцюгова реакція – метод синтетичного примноження (ампліфікації) специфічної ДНК-матриці, що базується на застосуванні специфічних компонентів – праймерів (олігонуклеотидів), у присутності нуклеотидних залишків і ферменту Таq-полімерази, яка каталізує цей процес.

Винайдення полімеразної ланцюгової реакції стало найбільш вражаючим відкриттям у галузі природничих наук після виходу у світ монографії Утсона та Крика «Подвійна спіраль», а автор цієї розробки, англійський вчений К. Мюлліс (1944-2019) отримав Нобелівську премію в 1993 р. у галузі біології.

За час, що минув, ПЛР стала основою методологій індикації, ідентифікації, типування і молекулярно-епідеміологічних та епізоотологічних досліджень у системі клінічної експрес-діагностики в гуманній та ветеринарній медицині.

Принцип ПЛР лишається незмінним попри наявність численних модифікацій методу. Він полягає у тристадійному процесі, під час якого на першому етапі проходить денатурація дволанцюгової ДНК з утворенням двох окремих ниток, на другому – відпал (гібридизація) праймерів на цих матрицях, а на третьому – полімеризація (подовження або елонгація), тобто відбувається комплементарне приєднання нуклеотидів від 3'-кінців праймерів назустріч один одному. Остання фаза каталізується Таq-полімеразою. Багаторазовим повторенням цих циклів досягається накопичення в геометричній прогресії продукту ПЛР у кількості, що візуалізується при електрофоретичному аналізі

результатів. Продукт, що утворюється під час реакції, називають ампліконом (рис. 4).

30-річний досвід світової науки відкрив чимало фундаментальних і прикладних аспектів застосування ПЛР у медицині та ветеринарній практиці. Зокрема, цей метод покладений в основу багатьох досліджень у сфері індикації та типування патогенів людини і тварин, діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, вивчення еволюційних процесів і молекулярно-епізоотологічних особливостей мікроорганізмів.

Тристадійність циклу ПЛР пов'язана з фізико-хімічними особливостями нуклеїнових кислот. Так, на першому етапі – денатурації, - відбувається руйнування водневих зв'язків між ланцюгами ДНК, що проходить у діапазоні температур 94–96 °С. У подальшому, при зниженні температури до 50–60 °С, відбувається комплементарне приєднання (гібридизація, відпал) праймерів (та зондів, у випадку ПЛР у режимі реального часу) на денатурованих ДНК-матрицях. При зростанні температури до 68–75 °С досягаються умови ізоферментної точки для полімерази, внаслідок чого настає остання фаза циклу – елонгація, в якій активований фермент у зоні кріплення праймерів розпочинає комплементарну полімеризацію нуклеотидів, добудовуючи новий ДНК-ланцюг. Повторення цих етапів на наступному циклі призводить до подвоєння кількості продукту, на наступному – подвоєння продуктів попереднього циклу і так далі, що забезпечує отримання достатньо високої концентрації продукту реакції визначеної довжини для його детекції.

Перевагами ПЛР, які вирізняють її з-поміж існуючих діагностичних методів, є:

Пряме визначення наявності збудника інфекційних хвороб. Багато традиційних методів, наприклад, імуноферментний аналіз (ІФА), виявляють продукти життєдіяльності інфекційних агентів та антитіла до них, що дає опосередковане свідчення про наявність інфекції. Виявлення специфічної ділянки ДНК-збудника методом ПЛР безпосередньо вказує на наявність збудника інфекції.

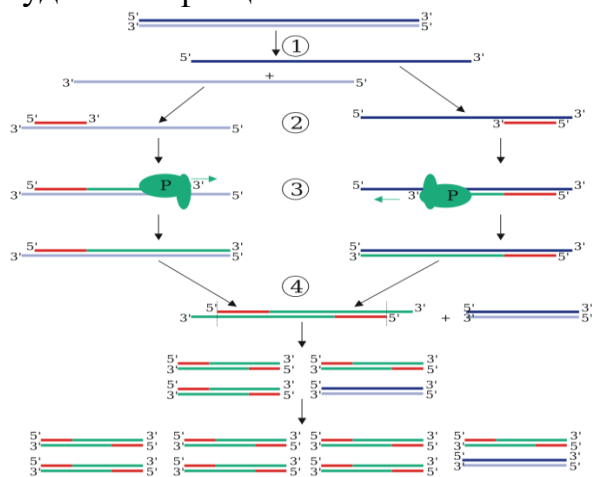


Рис. 4. Схема ПЛР: 1) денатурація; 2) відпал; 3) елонгація (подовження); 4) термінація та початок наступного циклу.

Висока чутливість. Аналітична чутливість тест-систем для ПЛР проявляється можливістю детекції від 10 до 100 клітин у пробі, а чутливість імунологічних і мікроскопічних тестів (ІФА і РІФ) дозволяє виявляти лише збудника при його вмісті на рівні 10000 – 1000000 клітин у пробі.

Діагностична чутливість ПЛР складає 98 %. Тобто за її допомогою можна виявити до 98 % інфікованих індивідів.

Висока специфічність. У досліджуваному матеріалі виявляється характерний тільки для даного виду збудника фрагмент ДНК, що зводить до мінімуму можливі хибно позитивні реакції. Специфічність ПЛР становить до 98,8 %.

Експресність виконання - тривалість аналізу за допомогою ПЛР становить лише 6-12 годин.

За допомогою ПЛР при скринінгу щодо інфекційних хвороб тварин та тваринницької продукції є можливість проведення групових досліджень.

Метод дає можливість, на відміну від традиційних серологічних методів, проводити аналіз серонегативних пацієнтів на ранніх стадіях інфекційного процесу (можливість виявлення персистуючих, латентних і рецидивуючих форм інфекцій), тобто коли лікування найбільш ефективне.

При використанні методу ПЛР є можливість визначити наявність збудника за короткі строки (аналіз на протязі доби).

Для дослідження підходить будь-який біологічний матеріал, що потенційно вміщує збудника.

Метод ПЛР дозволяє підвищити рівень діагностики збудників інфекційних та деяких паразитарних захворювань і забезпечити контроль ефективності лікування.

З-поміж сучасних генетичних технологій метод полімеразної ланцюгової реакції займає особливе місце. Він піднімає діагностику на принципово інший рівень – рівень виявлення ДНК чи РНК збудників, мутацій в геномі макроорганізму, що дозволяє проводити пряме виявлення інфекційного агента або генетичної мутації. За допомогою ПЛР одна молекула ДНК певного інфекційного агента може бути виявлена у присутності мільйонів інших молекул ДНК. Особливо ефективним виявилось застосування методу у ветеринарії, де в останній час використовується велика кількість різних комерційних наборів для ПЛР-діагностики.

5. Теоретичні аспекти ампліфікаційних методів аналізу нуклеїнових кислот

Не дивлячись на досить широкий перелік галузей застосування ПЛР у медицині та біології та зростання обсягів її впровадження, залишається чимало білих плям у розумінні базових понять, пов'язаних з молекулярно-генетичними дослідженнями. Торкаючись теоретичних і практичних аспектів у цій сфері слід зупинитись на основних поняттях, з ними пов'язаних, таких, як: праймери, зонди, полімераза, ревертаза та зворотна транскрипція, екстракція, елюція, Мастер-мікс, ампліфікація, електрофорез, секвенування, а також охарактеризувати призначення основних приладів і обладнання для проведення аналізу. Більшість з цих термінів має англо- або латиномовне походження.

Праймери або олігонуклеотиди (від англ. *primer* – першооснова, або початок, підручник для початківців) – це короткий синтетичний ланцюг дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК), який складається з 18–30 нуклеотидних залишків (н.з., син. – пар нуклеотидів, п.н.), поєднаних між собою за допомогою фосфодієфірних зв'язків. Праймери, як і ланцюг звичайної ДНК, мають 5'- та 3'- кінці.

У залежності від комплементарності до +- або –-ланцюга ДНК праймери бувають смисловими (прямими, *sense, forward*) та антисмисловими (непрямими, *antisense, reverse*) відповідно. Для звичайного ПЛР-аналізу використовують пару праймерів, а для реакцій секвенування – лише один.

Розрізняють три варіанти праймерних систем: праймери для детекції тих чи інших маркерів (єдиний їх критерій – комплементарність специфічній матриці), праймери для секвенування (олігонуклеотиди, що обмежують високоваріабельні ділянки) та праймери для напрацювання фрагментів для клонування (олігонуклеотиди, що обмежують таргетні ділянки з або без збереження їх функціональності, для яких специфічність не є критичною).

Іншим олігонуклеотидним компонентом, що використовується лише у ПЛР в режимі реального часу, є **зонди**. Вони фактично являють собою праймери, що містять молекули флуоресцентної мітки та гасника, які під час елонгації генерують світловий сигнал, що відповідає за інтенсивністю кількості специфічних матриць, з якими цей зонд гібридується, про що більш поглиблено мова піде далі.

Полімерази (*polymerase*) – клас ферментів, що стимулюють реакції полімеризації органічних речовин, наприклад, дезоксирибонуклеотидів у ДНК-ланцюг.

ДНК-полімерази (*DNA-polymerase*) – субклас ферментів, відповідальних за накопичення комплементарних ДНК на ДНК- або кДНК-матриці. Раніше для проведення ПЛР полімерази виділяли з клітин термофільних бактерій (*Taq*-полімерази), проте зараз їх отримують за методом рекомбінантних технологій у клітинах кишкової палички. ДНК-полімераза є основним ферментом, на дії якого базується ПЛР.

Ревертази або зворотні транскриптази (*revertase*) – субклас ферментів, відповідальних за синтез ДНК на РНК-матриці. Для потреб сучасної науки також отримують завдяки генно-інженерним технологіям.

Мастер-мікс (*Master-Mix*) (від англ. *Master* – спеціаліст, магістр, вчитель та *Mix* – суміш) – сукупність компонентів реакційної суміші для проведення ПЛР, основу якої складають буферний розчин з солями натрію та магнію, *Taq*-полімераза, дезоксирибонуклеозидтрифосфати (дНТФ) та деіонізована вода, у співвідношенні, оптимізованому в залежності від полімерази, нуклеотидного складу праймерів та інших факторів.

Технологічний процес постановки ПЛР складається з екстракції (вилучення) нуклеїнових кислот з біосубстрату за допомогою органічних (фенол, спирт, хлороформ) та неорганічних екстрагентів (речовин, до яких нуклеїнові кислоти переходять під час екстракції); у випадку виділення РНК – зворотної транскрипції, ампліфікації та візуального чи інструментального обліку результатів.

Зворотна транскрипція (*reverse transcription*) – це реакція, яка передуює ампліфікації при виявленні рибонуклеїнових кислот. Справа в тому, що молекули РНК через їх нестабільність не можуть бути використані як аналіт для ПЛР. Отже, існує потреба їх видозмінення в молекули кДНК (комплементарної ДНК). Для цього РНК обробляють ревертазою та дНТФ, котрі добудовують на РНК-матриці комплементарний ланцюг ДНК.

Ампліфікація (від англ. *amplification* – збільшення, примноження, поширення, приріст) – циклічна реакція логарифмічної полімеризації ДНК- або кДНК-матриці, яка проходить за умов відпалу специфічних праймерів і добудови нуклеотидного ланцюга між ними. У ряді випадків – тотожне з поняттям «полімеразна ланцюгова реакція».

Реакція ампліфікації проходить у програмованому термостаті, де за рахунок змін значень температури через відповідні проміжки часу відбувається каталіз ферментного циклу ДНК-полімерази та фізико-хімічного процесу гібридизації (відпалу) праймерів. Цей пристрій називається **ампліфікатор** або **термоциклер**.

Амплікон (таргетна ділянка) – видо-, типо-, групспецифічна ділянка ДНК- або кДНК-молекули, яка обмежена парою праймерів і логарифмічно накопичується під час ампліфікації.

Детекція (від англ. *detection* – виявлення) – виявлення продуктів ПЛР. Може бути візуальною (за спостереженням щодо наявності та розміру фрагментів ДНК-ампліконів у гель-системах в ультрафіолетових променях після фарбування флуорохромами або в білих променях після імпрегнації іонами срібла), а також інструментальною (за флуоресценцією в реальному часі або в кінці реакції (за кінцевою точкою)).

Фланкування (від англ. *flanking* – обмеження) – місця локалізації праймерів або праймерних ділянок на ДНК- або кДНК-молекулі.

Секвенування (від англ. *sequence* – послідовність) – процес визначення послідовності нуклеотидних залишків у ДНК- або кДНК-молекулі, що аналізується. Тест, призначений для ідентифікації збудника за видовим або генотиповим походженням, якщо це не є можливим за допомогою лише ПЛР-аналізу.

Філогенетичний аналіз (англ. *phylogenetic analysis*) – інструмент сучасної загальнобіологічної систематики, завданням якої є ідентифікація еволюційних відносин біологічних видів. Філогенетика вивчає походження видів, штамів і генотипів живих організмів.

Види ПЛР

Нестед-ПЛР (англ. *Nested PCR*, “вкладена” або “гніздова” ПЛР) — застосовується для підвищення специфічності детекції шляхом зменшення частки побічних продуктів реакції. Використовують дві пари праймерів і проводять дві послідовні реакції. Друга пара праймерів ампліфікує ділянку ДНК усередині продукту першої реакції.

Інвертована ПЛР (англ. *Inverse PCR*) — застосовується в тому випадку, якщо відома лише невелика ділянка усередині потрібної послідовності шляхом синтезу ДНК-копій назовні від місць кріплення праймерів. Цей метод особливо корисний, коли потрібно визначити фланкуючі послідовності після лігування ДНК-послідовностей до геному. Для здійснення інвертованої ПЛР проводять обробку ДНК рестриктазами з подальшим лігуванням. У результаті фрагменти з відомою послідовністю утворюються на обох кінцях невідомої ділянки, після чого можна проводити звичайну ПЛР.

Зворотно-транскриптазна ПЛР (ЗТ-ПЛР, англ. *Reverse Transcription PCR*, *RT-PCR*) — використовується для ампліфікації, виділення або ідентифікації відомої послідовності при дослідженні РНК-бібліотек. Перед проведенням ПЛР проводять додатковий етап – зворотну транскрипцію молекули РНК за допомогою зворотної транскриптази (ревертази), у результаті чого отримують комплементарну ДНК (кДНК). Метод застосовують для виявлення генетичного матеріалу РНК-вміщуючих вірусів, а також досліджують експресію генів за виявленням (у т.ч. кількісним) мРНК певних генів.

Асиметрична ПЛР (англ. *Assymetric PCR*) — проводиться у разі, коли є необхідність ампліфікувати переважно один з ланцюжків початкової ДНК. Використовується за виконання деяких методик секвенування та гібридизаційного аналізу. Навідміну від класичної ПЛР цей варіант проводиться з використанням двох праймерів, один з яких береться у надлишкній кількості.

Кількісна ПЛР (англ. *Quantitative PCR*, *qPCR*) — використовується для визначення кількості певної ДНК-матриці, кДНК або РНК у досліджуваній пробі. Цей метод зазвичай використовується у форматі реального часу або форматі детекції за кінцевою точкою, коли кількість ДНК-копій матриці-аналіту визначається автоматично. При цьому застосовують флуоресцентно мічені реагенти або інтеркалюючі барвники для точного вимірювання кількості продукту реакції у міру його накопичення або наприкінці реакції.

Touchdown ПЛР (англ. *Touchdown PCR*) — метод, за допомогою якого зменшують вплив неспецифічної гібридизації праймерів на утворення продукту. Перші цикли проводять при температурі, вищій за оптимальну температуру відпалу праймерів, потім кожні декілька циклів температуру знижують. За певної температури система пройде через точку оптимальної температури

гібридизації праймерів до ДНК-матриці, що сприяє підвищенню специфічності реакції.

Метод молекулярних колоній (або «ПЛР в гелі», англ. *Polony - PCR Colony*) — поліакріламідний гель полімеризують зі всіма компонентами ПЛР на поверхні і проводять ампліфікацію. У точках, які містять ДНК, до якої підібрані праймери, відбувається накопичення ДНК-продуктів з утворенням молекулярних колоній, які потім детектують в ультрафіолетовому світлі після обробки інтеркалюючими барвниками, що забарвлюють флюоресцентно зони утворення продуктів ампліфікації ДНК.

Геліказно-залежна ампліфікація (англ. *Helicase-dependent amplification*) — це реакція, подібна до звичайної ПЛР, але проходить вона за постійної температури. Для роз'єднання ланцюжків ДНК використовується геліказа замість теплової денатурації. Гелікази (або хелікази, від англ. *helix* — «спіраль») — клас ферментів, важливих для всіх організмів. Їх відносять до класу «молекулярних машин», оскільки вони використовують енергію гідролізу нуклеотидтрифосфатів (АТФ або ГТФ) для руху уздовж цукрофосфатного остову нуклеїнових кислот (ДНК, РНК, гібридів між ДНК і РНК) і розриву внутрішньо- або міжмолекулярних водневих зв'язків між основами. Виділяють дві великі позасистемні групи — ДНК-гелікази і РНК-гелікази.

Швидкісна ПЛР з ампліфікацією кінців кДНК (англ. *Rapid amplification of cDNA ends, RACE*) — ампліфікація матричної РНК (мРНК) за допомогою відомого фрагмента усередині цієї молекули.

ПЛР довгих фрагментів (англ. *Long-range PCR*) — модифікація ПЛР для ампліфікації довгих ділянок ДНК (10 тис.п.н. і більше). Використовують дві полімерази, одна з яких - Таq-полімераза з високою процесивністю (тобто полімераза здатна за один прохід синтезувати довгий ланцюг ДНК), а друга — ДНК полімераза з 3'-5' ендонуклеазною активністю. Друга полімераза необхідна для того, щоб коригувати помилки, що виникають при полімеризації нуклеотидів першою.

Випадкова ампліфікація поліморфної ДНК (англ. *Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD*) — метод, застосовуваний для розрізнення близьких за генетичною послідовністю організмів, наприклад, різні сорти та гібриди культурних рослин, породи тварин (продуктивних і домашніх) або близькоспоріднені мікроорганізми. У цьому методі зазвичай використовують один праймер невеликого розміру (20—25 п.н.). Цей праймер буде частково комплементарний випадковим ділянкам ДНК досліджуваних організмів. Підбираючи умови (довжину праймера, його склад, температуру тощо), вдається добитися задовільної відмінності картини ПЛР для двох організмів.

Мультиплексна ПЛР (англ. *Multiplex PCR*) — ґрунтується на використанні декількох пар унікальних праймерів в одній реакції ПЛР для отримання кількох продуктів ПЛР різної довжини. Така реакція заміняє кілька окремих реакцій ПЛР, які вимагали би більшої кількості реагентів та часу. Температури відпалу кожного з наборів праймерів повинні бути оптимізовані, щоби вони могли правильно працювати в межах однієї реакції. Крім того, розміри ділянок ДНК,

які ампліфікуються, повинні достатньо відрізнятися, щоб їх можна було розрізнити за допомогою гелевого електрофорезу.

Мультиплексна ампліфікація проб за допомогою лігування (англ. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA) дозволяє ампліфікувати кілька ділянок ДНК за допомогою однієї пари праймерів.

Підбір ділянок для ампліфікації

У системі конструювання засобів моніторингу та діагностики інфекційних, інвазійних і незаразних хвороб, а також імунопатій тварин на основі ампліфікаційних молекулярно-генетичних методів значне місце займають біоінформатичні розрахунки, спрямовані на створення штучних ДНК-молекул (праймерів для ПЛР, зондів, векторних систем тощо).

З метою проведення подібних обчислень існує чимало алгоритмів і різновидів програмного забезпечення. Основу теоретичного пошуку складають кілька етапів: множинне вирівнювання, пошук консервативних зон, вибір праймерних систем, оцінка їх за показниками біофізичної якості (температура плавлення, паліндромність та ін.) та специфічності (несумісності з ДНК або кДНК інших генетично близьких видів).

Важливим етапом, що передуює створенню праймерних систем, є обрання таргетного (цільового) гена, тобто гена, який теоретично є носієм передбачуваного продукту реакції. Чутливість майбутньої системи індикації залежить від характеру обраної ділянки, її нуклеотидного складу та меж варіювання цільової послідовності.

Обрання цільового гена для розрахунку праймерів зазвичай зумовлює мета розробки регламенту детекції. Розрізняють праймерні системи для широкої детекції (індикації мікроорганізмів), вузької детекції (ідентифікації та типування агентів), генотипування (секвенування та рестрикційного картування), клонування, методів ізотермальної ампліфікації, а також ДНК-зонди для ПЛР у реальному часі, мікрочипів та інших типів гібридизації.

У випадку створення групо-, родо- або родиноспецифічної (широкої) системи визначення обирають висококонсервативний для цільової групи мікроорганізмів таргетний ген. При розробці видо-, серотипо- і навіть штамоспецифічної (вузької) системи детекції використовують гени відповідного рівня консервативності, тобто специфічні в межах цільових таксонів або груп субтаксонного рівня.

Розробка праймерів для секвенування здійснюється шляхом обрання консервативних ділянок у генах з високим рівнем варіабельності, що робить цей ген найбільш цікавим для ДНК-аналізу. Ці ж олігонуклеотиди успішно можуть бути застосовані при вирішенні завдань з рутинної діагностики інфекцій з подальшими поглибленими дослідженнями за секвенуванням та іншими методами.

З метою розробки специфічних праймерів для клонування таргетним може бути ген з доведеними імунореактивними властивостями, та який експресується в системі вектор-хазяїн. Ці гени кодують імунологічно значимі протеїни, котрі можуть знайти застосування при створенні вакцин і діагностикумів, або білків тваринного походження, що мають біотехнологічне значення (цитокіни, інсулін

тощо). Клонування ділянок ДНК та кДНК для подальшого використання в якості позитивних контролів для ампліфікаційних методів виявлення ДНК/кДНК не ставить перед собою такої мети, і клонований фрагмент фактично є цільовим ампліконом, отриманим за допомогою тієї чи іншої методики індикації ДНК або кДНК.

Ампліфікація вірусних генів базується на застосуванні цільових найбільш вивчених генетичних детермінант, що представлені в базах даних секвенованих послідовностей у формі найбільших виборок у порівнянні з рештою проаналізованих ділянок геному. При необхідності створення системи родоспецифічної детекції як мішені використовують гени внутрішніх віріонних білків, а саме мембранних, нуклеопротейдних білків і деяких вірусних ензимів. У разі розробки вузькоспецифічної системи індикації та диференціації більшість авторів схильні вважати таргетними гени, що кодують білки поверхневих структур, гліко- і ліпопротеїдів і мають унікальні в порівнянні до споріднених вірусів ділянки досліджуваного гена.

Дані щодо нуклеотидних послідовностей всіх видів нуклеїнових кислот відомих на сьогодні організмів опубліковані у формі веб-сторінок на серверах баз даних, таких як GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), EMBL (База даних Європейської лабораторії молекулярної біології, www.ebi.ac.uk/embl), DDBJ (японська база даних нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, www.ddbj.nig.ac.jp), а також ряду інших. Знайдені в них послідовності будь-якого гена того чи іншого збудника можуть бути збережені у вигляді файлів локальних баз даних. При використанні он-лайн інструментів для аналізу генів та геномів і розрахунку олігонуклеотидів масиви даних можуть створюватись та аналізуватись в он-лайн форматі.

Після створення локальних підбаз даних в електронному варіанті на комп'ютері або виборок для он-лайн аналізу зазвичай проводиться множинне вирівнювання підбриних послідовностей.

Найбільш розповсюдженим модулем вирівнювання є ClustalW. Він може бути встановлений як самостійна програма, або бути вбудованим до складу більш сучасних програм для аналізу первинних структур нуклеїнових кислот і білків (BioEdit, Oligo, Vector NTI, Primer Premier та інших) та входити до складу онлайн інструментів.

Множинне вирівнювання є дуже важливим етапом досліджень, оскільки опубліковані різними дослідниками послідовності секвенованих генів-мішеней мають відмінності за довжиною, локусами початку та кінця розпізнавання тощо.

З метою побудови множинних вирівнювань також описані on-line модулі, такі як FASTA on-line, ClustalW on-line, котрі дозволяють здійснювати облік гомології, оцінку ступенів консервативності та підбір праймерів.

Важливим параметром розрахунку праймерів є вибір довжини ділянки, що ампліфікується. Найвищу чутливість мають системи праймерів, котрі фланкують ділянки довжиною 150–350 п.н.

Методи детекції більших за розміром ампліконів дещо менш чутливі. Праймери, які фланкують фрагменти довжиною більше за 1000–1200 п.н., загалом не підходять для використання в діагностичних тест-системах. Ділянки

понад 1500 п.н. у стандартній ПЛР не можуть бути ампліфікованими взагалі, оскільки потребують застосування полімераз зі збільшеним потенціалом полімеризаційної дії.

Найкращим варіантом є праймери, які на 70–100 % комплементарні до всіх варіантів таргетного гена, обов'язково з 3'-кінця.

У залежності від значення показників якості праймери шикуються до реєстру попарно.

Пари олігонуклеотидів підбирають таким чином, щоб їх температура плавлення відрізнялась не більше, ніж на 3 °С. Необхідно зауважити, що теоретично розрахована температура відпаалу праймерів не завжди дає змогу отримати високоякісний практичний результат, тому в практичних дослідженнях слід оптимізувати цей параметр.

Дещо іншим є процес конструювання праймерів для клонування. Їх підбирають експериментальним шляхом, враховуючи показники температури плавлення ($\Delta T \leq 3 \text{ }^\circ\text{C}$).

Важливо, щоб гіпотетично трансльований фрагмент продукту повністю відповідав матриці. Для цього на 5'-кінці теоретичного амплікону повинна розміщатись відкрита рамка зчитування, щоб ген був функціональним. Цю обставину прийнято не враховувати лише при клонуванні контрольних ДНК чи кДНК зразків.

Якщо продукт не вміщує рамки зчитування, вона добудовується перед тілом праймера, проте необхідно оцінити та попередити її зрушення, що можуть стати причиною утворення неспецифічного продукту.

На 5'-кінцях праймерів для клонування розміщують послідовності, що відповідають сайтам пізнавання рестриктаз, які застосовують при збірці вектора. Цей крок зараз не є обов'язковим, оскільки сучасні технології ТОРО та ТА-клонування дозволяють отримати химерні ДНК-продукти без попереднього утворення липких кінців.

Що стосується індикації та видової диференціації бактерійних патогенів, то найбільш розповсюдженою ПЛР-мішенню для них є гени рибосомальних РНК (табл. 2). Великою перевагою рибосомальних генів як мішеней для ПЛР є те, що вони являють собою своєрідне вдале поєднання висококонсервативних і гіперваріабельних ділянок.

Це дозволяє використовувати їх для вирішення різноманітних завдань: від простої ампліфікації до секвенування з метою видової, генотипової ідентифікації, вивчення мутацій тощо. Групи методів ампліфікації генів рибосомальної РНК дає можливість проводити загальнородову або групоспецифічну індикацію.

Деякі таргетні гени для ампліфікації бактерійних ДНК
(за PCR Detection of Microbial pathogens (Ed. **K. Sachse**), HP, NJ, 2002)

Таргетні гени	Мікроорганізм
16S рРНК	<i>Campylobacter</i> spp. <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> , <i>C. trachomatis</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Leptospira</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp. <i>Mycoplasma capripneumoniae</i> (F38) <i>Mycoplasma conjunctivae</i> <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC Group B streptococci <i>Yersinia enterocolitica</i> інші види бактеріальних патогенів
18S рРНК	<i>Cryptococcus neoformans</i>
16-23S міжгенний спейсер	<i>Campylobacter jejuni/coli</i> <i>Chlamydiaceae</i> spp. <i>Clostridium difficile</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Listeria</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Mycobacterium</i> spp. <i>Mycoplasma</i> spp. <i>Pasteurella multocida</i> serotype B:1 <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. <i>Streptococcus milleri</i> many bacterial species
23S рРНК	<i>Campylobacter</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp.
<i>omlA</i> (зовнішній мембранний ліпопротеїн)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
<i>ibp A + ibpB</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotypes
<i>архIVA</i> (токсин)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
<i>bcsp31</i>	<i>Brucella</i> spp.
Ген гіппурикази	<i>Campylobacter jejuni</i>
GTPase	<i>Campylobacter</i> spp.
<i>flaA</i> (флагеллін)	<i>Campylobacter jejuni/coli</i>
<i>ompA</i> <i>ompX</i> (головний зовнішній мембранний протеїн)	<i>Chlamydia psittaci</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. pecorum</i>
<i>plC</i> (фосфоліпаза C, а-токсин)	<i>Clostridium perfringens</i>
α-, β-, ε-токсин	<i>Clostridium perfringens</i>
α-, β-, ε-, ι-токсин та ентеротоксин	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>URA5</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>stx</i> (shiga-подібні токсини)	<i>Escherichia coli</i> (EHEC)
<i>uidA + eaeA + stx1 + stx2 + ehxA</i>	<i>Escherichia coli</i> (EHEC)
<i>hly</i> (гемолізін)	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>inlA + inlB</i> (інтерналіни)	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>iap</i> ген	<i>Listeria monocytogenes</i>

<i>hsp65</i> (heat shock протеїн)	<i>Mycobacterium avium</i> complex
<i>hsp65</i>	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>oppD+F</i> (олігопептидперміаза)	<i>Mycoplasma bovis</i>
<i>uvrC</i> (uv repair ген)	<i>Mycoplasma bovis</i>
p36 (цитолітичний протеїн) + p46 (мембранний протеїн)	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>M. hyorhinis</i>
<i>dtx</i> (дерматонекротичний токсин)	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>psl</i> (P6-подібний протеїн)	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>iktA</i> (лейкотоксин)	<i>Pasteurella haemolytica</i> , <i>P. trehalosi</i>
<i>rfb</i> гени (паротозсинтетаза)	<i>Salmonella</i> серогрупи
<i>invA</i> (інвазивний протеїн)	<i>Salmonella</i> серовари
В1 ген	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>yadA</i> (ген вірулентності)	<i>Yersinia enterocolitica</i>
IS 1111	<i>Coxiella burnetii</i>
IS 1533	<i>Leptospira interrogans</i>
IS 6110 + прямий повтор	<i>Mycobacterium bovis</i>
IS 6110	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
IS 6110 + прямий повтор	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex

Структурово гени рибосомальної РНК представлені трьома генами (16S рНК, 23S рНК та 5S рНК) та двома спейсерними регіонами.

Велика кількість методик, у тому числі й референтних, які увійшли до вказівок ВООЗ та МЕБ, з визначення та диференціації патогенних мікроорганізмів базуються на ампліфікації рибосомальних генів.

Найбільш розповсюдженими є регламенти ампліфікації бактеріальних ДНК за 16S рНК-геном (*Campilobacter Spp.*, *Chlamydia psittaci*, *C. trachomatis*, *C. pneumonia*, *Mycobacterium Spp.* та інших), що обумовлене невеликою кількістю даних щодо секвенування цього гену. Менш численні методики, де таргетним є 23S рНК-ген (*Mycoplasma Spp.*, *Listeria Spp.*, *Leptospira Spp.*, та інших).

Незважаючи на досить тривалий термін використання ПЛР-методик детекції рНК-генів, вони лишаються актуальними й сьогодні. Окрім того, тривають дослідження зі створення нових способів індикації та диференціації бактерій, спрямовані на відшукання більш чутливих праймерних систем.

Іншою групою таргетних генів для індикації ДНК бактерій є гени, що кодують структурову організацію мікробних протеїнів. Існуючі методи ампліфікації протеїнових генів засновані на детекції ДНК-структури видо- та серогрупоспецифічних антигенних детермінант, токсинів, бактерійних ферментів тощо. На основі ампліфікації ензим-кодуючих генів запропоновані методики детекції груп мікроорганізмів. У той же час, за ампліфікацією окремих генів розроблені тести для визначення серогруп і сероваріантів патогенних мікроорганізмів (*rfb* та *invA*-гени бактерій роду *Salmonella*).

Що стосується ампліфікації вірусних генів, то в якості цільових застосовують найбільш вивчені генетичні детермінанти, які представлені в базах даних секвенованих послідовностей. При необхідності розробки родоспецифічної системи ампліфікації, як правило, використовують гени внутрішніх віріонних білків: мембранних і нуклеопротеїдних білків (гени М та NP вірусів грипу А), деяких вірусних ензимів (тимідин-кінази та ДНК-полімерази поксвірусів і герпесвірусів) тощо.

У разі розробки вузькоспецифічної системи індикації та диференціації таргетними є гени, що кодують білки поверхневих структур, гліко- і ліпопротеїдів, та мають унікальні в порівнянні до споріднених вірусів ділянки досліджуваного гену (ген S-протеїну коровавірусу SARS-CoVi-2, ген гемаглютиніну вірусу грипу, F0-ген вірусу ньюкаслської хвороби, ген env вірусів імунodefіциту людини та вірусу лейкозу ВРХ тощо).

До окремої групи ПЛР-мішеней можна віднести кінцеві повтори вірусів лейкозів, 132 п.н.-регіон вірусу хвороби Марека, тандемні повтори інших вірусів, бактерій (*M. tuberculosis complex*, *M. bovis*, *Leptospira interrogans*) і навіть гельмінтів (рід *Trichinella*).

Отже, для створення та теоретичного дослідження якості праймерів, зондів та їх систем запропоновано чимало методичних і методологічних підходів, які ґрунтуються на термокінетичних показниках і рівнях гомології олігонуклеотидів до матриці. Зважаючи на розмаїття підходів і способів конструювання, а також програмного забезпечення, що застосовується з цією метою, існує необхідність оцінки та узагальнення даних щодо розробки праймерних та інших олігонуклеотидних систем, а також оцінки параметрів їх якості.

Питання обрання цільової послідовності є неодмінно значимим кроком при обрахунку праймерних ділянок. Вибір фрагменту генетичного матеріалу, що є об'єктом аналізу, визначає особливості чутливості та специфічності майбутнього тесту. Ступінь консервативності того чи іншого гена визначає стабільність праймерів. Високий рівень подібності послідовності спрощує оптимізацію протоколу, проте нівелює інформативність більш глибоких досліджень з ідентифікації субтипів збудника за аналізом точкових мутацій, інвертованих повторень, спейсерних ділянок, рестрикційно-ензимним аналізом чи секвенуванням геному. Високі рівні варіабельності деяких генів зумовлюють труднощі при розробці олігонуклеотидних систем. Останні в ході оптимізації протоколів ПЛР демонструють нижчу ефективність і специфічність реакції.

Як свідчать дані багатьох дослідників (Spackman E., Suarez D., Carua I., Monpe I. та інші), праймерні системи для індикації збудника, мають бути високоспецифічними до матриці, тобто 100 % комплементарними, чим забезпечать чутливу та надійну індикацію фрагмента геному патогена, або генетичного маркера макроорганізму, а також дозволятимуть диференціювати останнього від філогенетично найближчих генетичних послідовностей, споріднених організмів і всіх ймовірних контамінантів (як біологічних агентів, так і генетичного матеріалу). Праймери для диференціації організмів за певною ознакою, або праймери для типування патогенів, мають декілька підтипів. При цьому показник їх специфічності залежить лише від того, який тест є фінальним

при їх застосуванні. Якщо використання олігонуклеотидів пов'язане з секвенування чи патерним рестрикційним аналізом, специфічність гібридизації не має такого критичного значення, як у випадку, коли ПЛР є диференційним інструментом з визначення серогруп, патотипів збудників хвороб людини та тварин тощо.

Інша група праймерів, що застосовують для напрацювання штучних генів збудників чи макроорганізмів з метою створення генно-інженерних конструкцій, не має і не повинна мати високу специфічність щодо відпалу, оскільки їх застосування супроводжується утворенням продукту, чия специфічність доводиться емпірично при постановці додаткової ПЛР з внутрішніми праймерами до вбудованого фрагмента зі 100 % комплементарністю до матриці.

Обрання таргетних генів для детекції та типування вірусів тварин ми здійснювали за аналізом послідовностей, наявних у базах даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) та DDBJ (www.ddbj.nig.ac.jp), на підставі кількості вказаних послідовностей та ступенів видової та міжвидової варіабельності гена. При цьому вірогідною доцільно виявилось вважати вибірку при дизайні праймерів для виявлення збудників інфекцій людини або тварин, якщо вона налічувала від 7–8 послідовностей з різних географічних зон, що мало забезпечити її репрезентативність.

З метою створення праймерів для виявлення вірусів певних родів вибірку необхідно було здійснювати за генами групспецифічних протеїнів (внутрішні білки та ферменти, або некодуючі області), що визначало їх широку специфічність, а для розробки видоспецифічних праймерів і праймерів для генотипування доцільно було використовувати гени антигенних протеїнів, чії структурні особливості корелювали з кодованими ними ознаками.

При створенні праймерів для виявлення збудника коронавірусної інфекції людини найбільш показовим є таргента детекція його за ампліфікацією гену S, що кодує головний антиген вірусу – S-протеїн. Сучасні системи також орієтовані на мультиплексну детекцію вірусу за кількома генами (до гену головного антигену додаються в якості цільових гени внутрішніх білків M та NP). Такий формат виявлення збудника COVID-19 забезпечує суттєве підвищення діагностичної ефективності систем діагностики.

Для розробки праймерів з виявлення ортоміксовірусів (вірусів грипу людини та тварин) вибір таргетних генів ґрунтується на даних про наявність групспецифічних і типоспецифічних генетичних мотивів у РНК-послідовностях вірусів грипу. До числа перших відносяться гени матриксного протеїну та нуклеопротеїну, що у світовій практиці є основними мішенями при ПЛР-індикації вірусів типу А.

За результатами власних досліджень з біоінформатичної оцінки вибірок цих генів встановлено, що для індикації вірусів грипу А найбільш придатним є ген матриксного білка. Цей ген на відміну від сегменту РНК, що кодує нуклеопротеїн, на момент створення праймерів був представлений більшою кількістю послідовностей (8027 проти 2257) та мав обмежене число нестабільних регіонів.

Для ідентифікації вірусу за підтипом обрання ключових генів було зумовлено особливостями їх організації та кодованими продуктами. Послідовності генів гемаглютиніну (n=1583) та нейрамінідази (n=1087) підтипу H5N1 продемонстрували гомогенність всередині вибірок, з огляду на це останні було звужено до 35–50 послідовностей, що не зменшувало вірогідності отримуваних результатів.

Підбір генів полімераз вірусу є необґрунтованим, оскільки частині цих послідовностей був властивий високий рівень консервативності, а частина мала значні відмінності, що не корелювало з генотипом і патотипом вірусу. Доказом правильності цього напряму є роботи наших попередників, які довели ненадійність застосування ПЛР з праймерами на гени полімераз.

Таргетні послідовності для виявлення вірусу ньюкаслської хвороби також необхідно відбирати з огляду на можливість індикації та типування вірусу. Аналіз спеціальної літератури з цього питання дозволив зупинитись на гені F, який, згідно даних Aldous E.W., може бути застосований для генотипування вірусу. На аналізі нуклеотидних послідовностей згаданого структурного мотиву геному збудника базується більшість повідомлень з генотипування чинника та молекулярно-епізотологічних досліджень при ньюкаслській хворобі. Методики з діагностики захворювання, що базувались на ампліфікації цього гена, були запропоновані Collins M., Aldous E., Smietanka K., Alexander D. та іншими вченими. Цей фрагмент вірусного геному представлений у базах даних у кількості 2485 послідовностей, що також дозволило застосовувати його для розрахунку праймерів.

Аналіз послідовностей гена F ВНХ показав доцільність застосування його не тільки для індикації, але й для генотипування збудника. Це пояснюється наявністю в його структурі основного мотиву патогенності (сайт розрізування F1/F2) поряд зі значним ступенем варіабельності деяких ділянок на фоні присутності високо консервативних зон.

Дослідження геномів герпесвірусів тварин показали наявність незначного масиву інформації щодо структури нуклеотидних послідовностей цих збудників (n=4–20 по окремих генах). Послідовності для створення праймерів були зібрані шляхом аналізу найбільших вибірок, що мали однорідну видоспецифічну структуру. Для вірусів ІРТ та хвороби Ауескі такими генами виявились гени глікопротеїнів, а для вірусу ІЛТ – ген тимідинкінази. Обрання генів глікопротеїнів вірусів ІРТ та Ауескі було проведено з метою пошуку нових рішень щодо індикації збудника, оскільки традиційні підходи описані Brunner D. та Yason C.V., що базувались на ампліфікації генів тимідинкінази, були недостатньо чутливими та не відповідали вимогам сьогодення. У той же час до генів глікопротеїнів, що ми обрали, вже створені та з успіхом застосовуються у Німеччині (Beier D., персональні контакти) праймерні системи, а з моменту їх розробки опубліковані нові послідовності, що не виключають розробку більш ефективних протоколів детекції. Вони ж могли потенційно стати підґрунтям для впровадження стратегії DIVA при профілактиці герпесвірозів тварин, адже марковані вакцини майже всі базуються на глікопротеїн-дефектних мутантах вірусів.

Для діагностики африканської чуми свиней (АЧС), описано чимало таргетних послідовностей, які пропонуються для використання в якості ділянок для ампліфікації, проте золотим стандартом лишається ген p72 (Gallardo C., 2021), який використано і вітчизняними дослідниками з метою детекції цього особливо небезпечного збудника, що загрожує продовольчій безпеці (Gerilovych A., 2018).

Пошук таргетних генів для виявлення цирковірусів свиней здійснювали з огляду на необхідність створення універсальних праймерів для індикації, ідентифікації та генотипування вірусу. У базах даних виявлено 1628 послідовностей, що включали повні геноми, гени реплікативного та капсидного протеїнів та їх ділянки. Зважаючи на поставлені задачі, у якості таргетного був обраний ген реплікативного протеїну (n=182), оскільки він містив варіабельні мотиви, що визначали генотипову належність вірусу та серотипоспецифічні консервативні фрагменти. Це дозволяло провести обчислення праймерів для ідентифікації та генотипування вірусу. Цей ген, на думку Abrahams B.J., Kim J., Fenaux M. та інших вчених, є достатньо консервативним для індикації патогена, і, водночас, містить чимало перспективних областей для секвенування, демонструючи не тільки генотипову варіабельність чинника, але й є своєрідним «дзеркалом» еволюційних процесів у популяції вірусу. Аналогічні висновки зроблені і по відношенню до нового типу цього збудника ЦВС-3 (Rudova N., 2021).

Для індикації вірусу діареї ВРХ був обраний ген поліпротеїну (n=288), який має відмінні від решти пестивірусів і консервативні для всього роду локуси. Методології та протоколи наших попередників, зокрема S. Belak, S. Vilcek, E. Peterhans та інших, також базувались на ампліфікації згаданого фрагменту геному вірусу. Крім того, зазначений мотив характеризувався не лише стабільністю в консервативних і видоспецифічних ділянках, але й демонстрував перспективність для секвенування та наступних молекулярно-епізоотологічних досліджень. Такий саме принцип покладений і в основу детекції вірусів прикордонної хвороби та класичної чуми свиней.

Методики детекції вірусу блютангу передбачають детекцію та диференціацію певних серотипів вірусу за генами, що кодують імунологічно значущі антигенні детермінанти (VP-2 тощо).

Розрахунки праймерних систем для виявлення вірусів репродуктивно-респіраторного синдрому свиней базуються на створенні олігонуклеотидів до 5 та 7 рамок зчитування, які мають, як видову, так і генотипову специфічність. Те саме стосується і принципів створення праймерів для виявлення асфарвірусу африканської чуми свиней.

Отже, система підбору таргетного гена для різних видів вірусів повинна ґрунтуватись на засадах достовірності вибірки та знанні структури гена, щоб забезпечити відповідність майбутніх праймерів задачам дослідження (родова, видова, серотипова, патотипова чи генотипова ідентифікація патогена тощо).

При дослідженнях стосовно наявності маркерів генетичної резистентності, то таргетними слугують мінливі гени або різноманітні сателітні локуси, що відповідають за набуття організмом тих чи інших ознак.

Маркери мутацій на хромосомному рівні також зачіпляють ті чи інші послідовності, що описано в спеціальній літературі.

При оцінці сільськогосподарської сировини та продукції щодо вмісту генетично модифікованих компонентів існує декілька критеріїв підбору таргетних генів. Перший варіант – індикація ГМО – базується на комплексі методів з виявлення маркерів модифікацій – 35S-промотеру, NOS-термінатору, або плазмідних мотивів – ген резистентності до ампіциліну та ін. Ідентифікація ГМО базується на ампліфікації з праймерами, комплементарними до вбудованої матриці-маркеру, що відповідає за змінені властивості конструкції. Найбільш складний тест – кількісна оцінка щодо вмісту ГМ-компонентів базується на дослідженнях у реальному часі зразків проти панелі контролів з різним вмістом з наступною математичною обробкою результатів.

Розробка праймерів

Пошук праймерних ділянок повинен здійснюватись на основі кількох основних базових правил. По-перше, праймери – це консервативні фрагменти ДНК або кДНК, а отже їх розрахунку має передувати пошук неваріабельних локусів, щоб забезпечити їх специфічну гібридизацію на максимальній кількості послідовностей різних штамів. По-друге, у залежності від потреб дослідження, має бути теоретично оцінений та обраний фланкований ними амплікон. Так, якщо існує необхідність лише виявлення збудника, то передбачуваний продукт реакції не обов'язково має бути поліморфним у різних ізолятах досліджуваної вибірки, оскільки кінцевою метою дослідження не є порівняння послідовностей. У тому випадку, коли є потреба у вивченні філогенетичних зв'язків вірусів за структурою амплікону, тобто отримувати фрагменти призначені для секвенування, обмежена праймерами ділянка, на нашу думку, повинна бути якомога більш варіабельною за нуклеотидною послідовністю.

З метою виявлення консервативних зон генів нами апробовано декілька алгоритмів пошуку, а саме, відомі матриці порівняння BLAST та FASTA on-line, Clustal W, BioEdit (ClustalW), Vector NTI (ClustalX).

При застосуванні матриці Clustal W у формі окремої програми виникав ряд незручностей на зразок необхідності користуватись командним рядком і внаслідок спрощеного дизайну її інтерфейсу.

Ті самі технічні можливості мали програми BioEdit та Vector NTI, до яких вбудовано модуль Clustal, як сервіс-програму. У той же час, їх застосування надавало ряд переваг, таких як: багатоформатний режим роботи, можливість детектувати та документувати результати у вигляді відокремлених файлів, а також отримувати наглядне рівняння з незалежними послідовностями. При цьому дослідник має можливість роботи з кожною з аналізованих послідовностей окремо. Ці позитивні риси, а також їх можливість роботи з on-line базами даних і зумовили те, що наш вибір було віддано локальному програмному забезпеченню.

Згідно з літературними даними щодо пошуку консервативних зон гена та проведення множинних вирівнювань ці процеси передбачають три етапи:

- попарне порівняння;
- побудова Boot-Strap дендрограм;

- побудова множинного рівняння на основі аналізу множини дендрограм.

Проведений нами аналіз ефективності різних модифікацій цієї біоінформаційної процедури показав доцільність застосування динамічного програмування, а саме глобального порівняння (урахування всіх ймовірних попарних дистанцій між позиціями та оптимізація показників схожості) за алгоритмом S.V. Needleman та C.D. Wunsch. Число Boot-Strap при цьому має дорівнювати не менше 1000, що забезпечує отримання достовірних рівнянь, які не потребують коригування. Як показали наші дослідження на моделі цирковірусу свиней, рівняння, проведені за допомогою BioEdit, мають високу точність структурової конфігурації, вміст антисмислових зсувів і хибних делецій був мінімальним (менше 0,02 %) (рис. 5).

Отримані результати вирівнювання документують завдяки користуванню відповідною опцією програмного забезпечення з пошуку стабільних регіонів. Перелік оптимальних параметрів пошуку консервативних ділянок для обчислення праймерних ділянок був сформульований нами наступним чином: сегменти не повинні вміщувати зсувів, що можуть виникнути за рахунок делецій та інсерцій нуклеотидів, зашкодивши гібридизації майбутніх праймерів з ДНК-матрицею. Розмір фрагментів для аналізу не повинен бути меншим за 50 п.н., а рівень ентропії позицій – не вище 0,2, тобто ступінь консервативності має бути вираженим для всіх послідовностей, задіяних при вирівнюванні. У разі неможливості знаходження зон з цими ознаками ми допускаємо підвищення ентропії – до 0,8, а сумарної ентропії – до 0,3, оскільки за цих умов можна сконструювати вироджені праймери або нівелювати заміни при гібридизації шляхом зниження температури відпалу.



Рис. 5. Вибірка послідовностей цирковірусу свиней II серотипу до (а) та після (б) множинного вирівнювання (англомовний менеджер нуклеотидних послідовностей BioEdit).

Наявність консервативних регіонів у випадку користування програмою BioEdit відображається у вигляді окремого текстового файлу, дані з якого могли бути застосовані з метою підбору праймерних послідовностей. При користуванні ж програмою Vector NTI ділянки, що мають низькі рівні ентропії, тобто є консервативними, можна спостерігати лише візуально, що також негативно характеризує цей програмний продукт.

При створенні праймерних систем для діагностики інфекцій та типування патогенів, а також при розробці праймерів для клонування характер (стабільність чи нестабільність щодо мутацій) та ступінь варіабельності (загальна ентропія регіонів) нуклеотидної послідовності між праймерами не мають високого значення, оскільки не можуть вплинути на результат реакції. При дизайні праймерів для секвенування велике значення мали показники ентропій послідовностей, що фланкувалися ними. Вони повинні були перевищувати значення 0,2 за позиціями та мати сумарне значення 0,4 і вище, що віддзеркалювало ступінь варіабельності ділянки-аналіту. Це в подальшому надавало б змоги секвенувати більш цікавий з точки зору аналізу нуклеотидного поліморфізму продукт. Крім того, на етапі дослідження консервативності послідовностей важливо було оцінити локуси ймовірних мутацій, що присутні у збудників аналізованого виду. Після визначення консервативних ділянок при дизайні таких праймерів слід було обирати такі, що обмежували б найбільш варіабельні фрагменти та розраховувати праймери саме на них.

З метою подальших досліджень використовували вибірки, що мали принаймні дві висококонсервативні ділянки, а відстань між ними становила щонайменше 120–150 п.н. Якщо теоретичний амплікон мав би меншу довжину, то його візуалізація ускладнювалась би внаслідок малої розбіжності між праймерами, їх димерами та його власним розміром.

Обчислення олігонуклеотидних пар, що являє собою математичну оцінку консервативних послідовностей з визначенням їх термодинамічних особливостей, варто було б також здійснювати за допомогою програмного забезпечення, адже перевірка всіх можливих варіантів у неавтоматизованому режимі була б довготривалою та малоефективною. При формулюванні алгоритму цих досліджень нам необхідно було порівняти різні програмні продукти за критеріями зручності в користуванні та загальної доступності. До числа відомих програм, що застосовуються з метою обрання праймерних пар відноситься декілька програм, зокрема Vector NTI, Primer Premier, Beacon Designer, Laser Gene, AmplifX, Oligo Software та інші.

На сьогодні важливим елементом праймерного дизайну є застосування онлайн інструментів, таких як OligoCalc та інших.

Більшість з off-line калькуляторів базується на обчисленні олігонуклеотидів за однією послідовністю, що завантажується до програми, після чого вводяться параметри пошуку та вказуються консервативні ділянки для його здійснення.

З огляду на дані літературних джерел і власний досвід нами зроблено висновок: параметри пошуку праймерів для індикації та типування патогенів за виявленням їх генетичного матеріалу повинні ґрунтуватись на положеннях, які

характеризують термо-кінетичні особливості праймерів, параметри утвореного внаслідок їх відпалу продукту та його цільове призначення.

Особливості праймерів та їх пар мають бути оцінені за наступними параметрами якості: довжина, близькість температур плавлення, апаліндромність, GC-вміст, GC-вміст 3'-кінця, виродженість.

Так, довжина праймера має дорівнювати 18–24 та більше п.н., що забезпечує його унікальність порівняно до ймовірних подібних послідовностей.

Різниця температур плавлення олігонуклеотидів в умовах вмісту іонів магнію, який каталізує кріплення субодиниці полімерази до місця гібридизації праймерів з матрицею, на рівні 50 мМ/мл не повинна відрізнятись більше, ніж на 3 °С. Порушення цього параметру було б здатне негативно вплинути на оптимізацію чутливості та специфічності ПЛР, отримання чистих продуктів для клонування та секвенування.

Іншими важливими показниками якості праймерів є GC-вміст і GC-вміст 3'-кінця, що зумовлювали температуру їх плавлення та відпалу. Чим вище був вміст означених основ, тим вище ставала температура відпалу праймерів. Вважається, що за так званих базових умов температура відпалу має знаходитись у межах 55–65 °С. За низького вмісту пурінових основ температура буде низькою, а оптимізація щодо специфічності ускладнюватись. При надвисокому вмісті буде те саме. Оптимум GC-вмісту мав становити 50±5 %, а GC-вміст 3'-кінця – від 50 до 75 %.

При розрахунку праймерів слід уникати залучення до послідовностей паліндромних (взаємно або самокомплементарних) фрагментів, що потенційно можуть зумовити самодимеризацію праймерів, утворення шпильок та взаємовідпал при використанні у ПЛР. Ймовірність виникнення цих вторинних ДНК-структур можна оцінити за всіма специфічними програмами для створення праймерів. При цьому обрання праймерів з числа запропонованих програмою за параметрами паліндромності необхідно здійснювати з огляду на енергетичний потенціал, необхідний для утворення неканонічної структури. Оскільки праймерів, що не мають жодних проявів паліндромності, не існує, то межі вибору звужуються до невикористання шпилькоутворюючих і димеризуючих олігонуклеотидів, де енергія зв'язку становить менше 2,0 та 1,5 ккал/М відповідно. Можливість виникнення вторинних структур за більш високих потреб енергії на практиці майже не є ймовірною.

Останнім критерієм оцінки при виборі праймерів служить їх виродженість, тобто наявність заміन у тілі праймеру. В області 3'-кінця заміни були неприпустимі, оскільки вони виключали гібридизацію відпал праймерів з матрицею, яка починається саме з 3'-кінця. У разі наявності дефектних (вироджених) ділянок реакційна здатність олігонуклеотидів може теоретично знижуватись, оскільки кількість комплементарного праймеру буде на 2ⁿ нижче (n – кількість дефектних зон, тобто замін). При відсутності консервативних ділянок достатньої довжини для уникнення залучання дефектних локусів слід було обирати фрагменти, що містили не більше трьох позицій, де заміни були найбільш ймовірними.

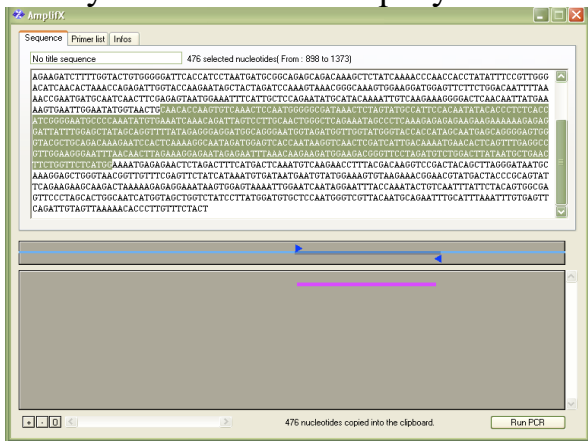
За результатами аналізу спектру програм, запропонованих для використання, ми скористались доступними нам трьома: Vector NTI, AmplifX та Oligo Software. Як показали дослідження різних типів послідовностей, усі означені програми дозволяли проводити розрахунок праймерів. Недоліком програми Vector NTI була обмеженість можливості щодо вибору з числа обчислених пар. Програми пакету Oligo Software надавали можливості спершу обчислювати, а потім покроково аналізувати кожну пару.

Програма AmplifX обчислює чимало ймовірних праймерів та, згідно нашого висновку, мала найбільш зручні програмні можливості щодо документування результатів. За її допомогою можна також перевіряти комплементарність створених праймерів щодо всіх послідовностей використаних з метою побудови множинного вирівнювання та пошуку консервативних зон, завдяки чому для подальших досліджень з метою дизайну праймерів була використана саме програма AmplifX. За її допомогою також можна було надійно визначити широту детекції в межах таксонів-аналітів і специфічність праймерів по відношенню до найбільш філогенетично близьких таксонів (рис. 6).

Розробка праймерів для клонування фрагментів, за нашими даними, має ґрунтуватись на результатах оцінки структури гена, його положення в геномі вірусу чи бактерії. При цьому важливо ідентифікувати локуси промотору(ів) та термінатору для кожної рамки зчитування, що клонують.

Якщо клонований фрагмент відповідає за синтез білка та має зберігати таку властивість у складі векторної системи, необхідно чітко визначити крокову позицію старту рамки зчитування відносно прототипової молекули, тобто оригінальної ДНК, і за методу трансляції послідовності нуклеотидів у амінокислотну послідовність пересвідчитись у правильності отриманих у процесі розрахунків результатів.

Цей етап перевірки є критичним, адже за присутності зсуву лише на одну позицію можна було отримати зовсім інший білок, або майбутня векторна молекула не мала б експресуючих властивостей.



а)



б)

Рис. 6. Теоретична ампліфікація гена Н5 вірусу високопатогенного грипу (а) та гена Н7 (б) з праймерами, специфічними до гена Н5 (скріншот з англomовної програми AmplifX 1.4.

Після ідентифікації старт-кодону та стоп-кодону рамки зчитування необхідно пересвідчитись щодо наявності їх у фланкованій послідовності. Прямий праймер у своєму тілі має вміщувати старт-кодон, що відповідав би оригінальному для організму-донора гена, або штучний, розташування якого мало відповідати триплетній позиції старт-кодону (без амінокислотних зсувів, що потенційно ведуть до змін складу цільового білкового продукту). У випадку конструювання праймерів для клонування фрагментів їх довжина має складатися не тільки з комплементарної щодо матриці ділянки, яка сягає до 18–26 п.н., але й сайту пізнавання рестриктаз (6–8 п.н.), які б забезпечили злиття синтетичного гена з реципієнтною ДНК, та вільної ділянки (2–6 п.н.), що компенсувала GC-вміст створеної структури до рівня 50 % та сприяла формуванню «липких» кінців після рестрикційної обробки ПЛР-продукту.

Подальше дослідження ефективності обрахунку за допомогою згаданих програм було проведено шляхом макроаналізу розрахованих послідовностей, що дозволяло в режимі on-line порівняння передбачити ймовірні неспецифічні реакції.

Важливим етапом у селекції праймерних пар є їх дослідження за показниками не тільки ПЛР-якості, аналіз яких наведено в попередньому підрозділі, а й за внутрішньовидовою специфічністю та широтою детекції – факторами, що в ході експериментальної роботи над протоколом індикації нуклеїнових кислот збудників мають критичне значення.

Під широтою детекції в цьому аспекті слід розуміти максимальну кількість послідовностей відповідного гена конкретно взятого збудника, який є об'єктом досліджень. Таксономічна відповідність праймерів – це фактично їх некомплементарність з ДНК або кДНК збудників відмінних від об'єкту детекції видів, а також з НК еукаріотичних організмів. Таксономічна відповідність фактично зумовлює внутрішньовидову специфічність, тобто неспроможність олігонуклеотидів гібридизуватись з гетерологічними зразками.

З метою оцінки таксономічної відповідності обраних праймерів доцільним є аналіз щодо комплементарності їх специфічній та неспецифічній матрицям. Це дозволяє визначити можливості щодо детекції певного патогену та прогнозувати ймовірні неспецифічні реакції з генетичним матеріалом, що не є цільовим у реакції. Необхідність цих досліджень можна пояснити особливостями пробопідготовки для ПЛР. Виділення нуклеїнових кислот супроводжується отриманням сумарного зразка, що потенційно може вміщувати ДНК та РНК тварини, від якої взята проба, бактерій та вірусів, що не є об'єктами дослідження. Існує також ймовірність потрапляння до екстрактів НК людини, рослин тощо. Отже, на перших етапах нашої роботи були проведені аналітичні дослідження щодо відпрацювання режимів перевірки внутрішньовидової специфічності.

Off-line дослідження ґрунтувались на віртуальній ампліфікації створених праймерів і послідовностях гена до якого розраховували олігонуклеотиди. Завдяки цьому аналізу попередньо встановлювалась внутрішньовидова специфічність і широта детекції методики. У наших дослідженнях були використані дві системи локальної чи off-line оцінки: за допомогою програм

AmplifX та Fast PCR. Першій, внаслідок можливості створювати та аналізувати праймери одночасно, було віддано пріоритет у подальшому.

On-line дослідження широти детекції та внутрішньовидової специфічності є найбільш перспективним та інформативним в оцінці якості розроблених олігонуклеотидів. Воно забезпечує максимально повну перевірку створених праймерів шляхом вирівнювання їх послідовностей зі специфічними та неспецифічними матрицями, що містяться в базах даних GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) та DDBJ (www.ddbj.nig.ac.jp). Вища вірогідність цих досліджень пояснюється доступністю для аналізу всіх наявних послідовностей, чого проблематично досягти при формуванні локальних баз даних.

Існує два типи такого аналізу: BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool – система оцінки, що базується на локальному оцінюванні в процесі вирівнювання) та FASTA (Frame Alignment Sequence Tool Agent – базується на глобальному алгоритмі вирівнювання). Враховуючи потенційні можливості цих варіантів, ми зупинились на застосуванні тих модулів, що вміщує сайт японської бази даних нуклеотидних послідовностей DDBJ (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>).

Даний вибір можна пояснити наявністю на вказаному сайті найбільш зручного для користування опційного інтерфейсу, що дозволяв проводити BLAST-аналіз праймерів у різних базах даних, які поєднували нуклеотидні послідовності різних видів тварин, вірусів, бактерій, людини тощо. У дослідника при їх застосуванні є можливість регулювати глибину ретельності аналізу за числом припущень та кількістю послідовностей-гомологів, кількість вибірки, матрицю обрахунку, довжину відрізка рівняння тощо. Цей же електронний ресурс містить засоби FASTA-аналізу з урахуванням усіх наведених вище показників, а також верхнього та нижнього кордонів припущень, можливості регулювати чутливість пошуку та оптимізувати відсоток відповідності послідовності-аналіту до послідовності-матриці.

Використання алгоритму BLAST дозволяє ефективно визначати широту детекції системи праймерів при повній комплементарності до матричної послідовності, у той час як FASTA-аналіз забезпечував високовірогідне обчислення внутрішньовидової специфічності та ймовірних перехресних реакцій.

Для ілюстрації цих тверджень розглянемо ефективність вказаного алгоритму на конкретному прикладі. Нами проведено аналіз щодо широти детекції праймерів для виявлення ДНК герпесвірусу інфекційного ларинготрахеїту (ІЛТ). У результаті проведених пошукових досліджень щодо праймерних пар і після оцінки їх якості для застосування у ПЛР було відібрано олігонуклеотидну пару ILTV_f/r, що фланкують ділянку гена тимідинкінази довжиною 176 п.н.

Як показано на рисунку 7, з метою встановлення широти детекції був проведений аналіз у програмному модулі BLAST on-line (блок з оцінки blastn), а саме, пошук гомології праймерів з нуклеотидними послідовностями вірусів,

довжина відрізка рівняння (порівнювальної області за один крок) – 7 позицій (нуклеотидів), дольова частка гомології – 1,00.

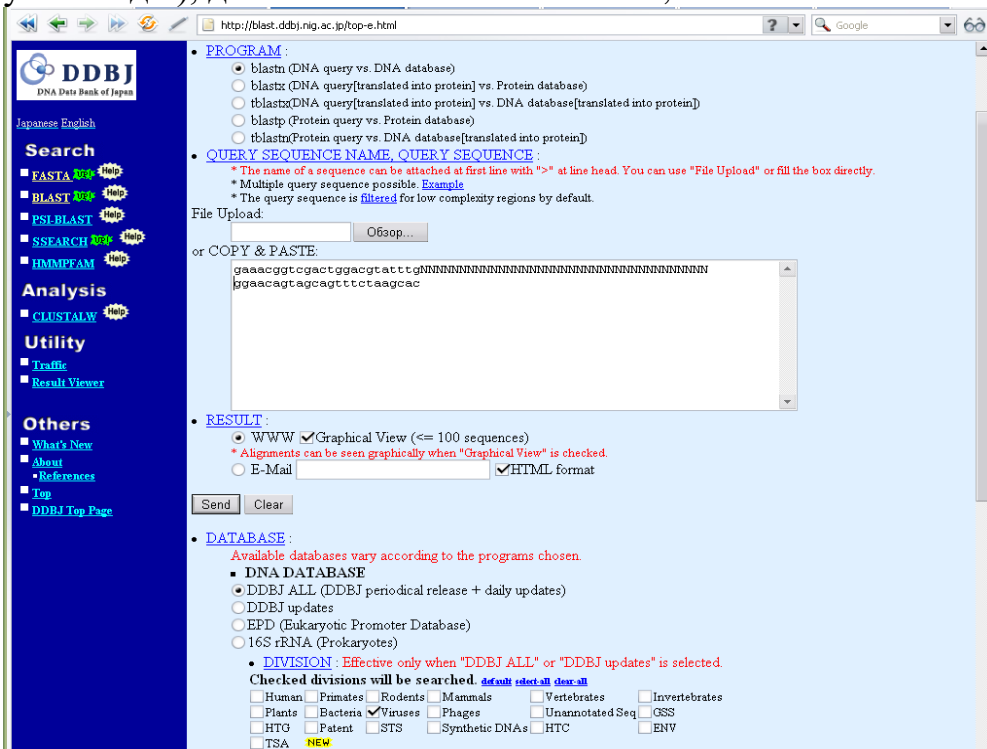


Рис. 7. Пошукове діалогове вікно програми BLAST on-line при оцінці широти детекції олігонуклеотидної пари ILTV_f/r, що фланкує ділянку гена тимідинкінази довжиною 176 п.н. вірусу ILT.

За результатами аналізу встановлено, що вказана праймерна система комплементарна та теоретично може гібридуватись з 86 секвенованими послідовностями ізолятів вірусу, виділених у різних країнах світу. Ідентичність до матриці обох праймерів за умов вищенаведених параметрів пошуку складала 92–100 %. Змінених локусів у ділянці 3'-кінців, що було б критичним для подальших досліджень, виявлено не було (рис. 8).



Рис. 8. Діалогове вікно програми BLAST on-line з результатами оцінки широти детекції олігонуклеотидної пари ILTV_f/r, що фланкують ділянку гена тимідинкінази довжиною 176 п.н. вірусу ILT.

Наступним етапом робіт щодо оцінки якості праймерів є дослідження їх внутрішньовидової специфічності. Вивчення вказаного параметру якості обраних послідовностей доцільно проводити за допомогою механізмів глобального вирівнювання. У цьому випадку необхідно було б оцінювати не тільки співпадіння окремо взятої послідовності, але й проводити аналіз усіх виявлених гомологій. Дослідження за FASTA надавало можливості виявляти комплементарність праймерів до матриці навіть при наявності однієї чи декількох заміни без урахування довжини послідовності, що забезпечувало найефективніший пошук ймовірних специфічних і неспецифічних гібридизацій.

При цьому аналіз обох праймерів за параметрами 100–500 співпадин дозволяв встановлювати тотожність до матриць як гомологічних, так і гетерологічних з оцінкою ймовірних критичних точок реакції. Якщо під час аналізу нуклеотидні заміни по відношенню до нецільових послідовностей виявлялися на 3'-кінцях олігонуклеотидів, такий вид гомології вважався некритичним оскільки відпалу за реальних умов у цьому випадку бути не могло. Некритичним є й високий процент гомологій, якщо лише один з олігонуклеотидів пари виявляється комплементарним до гетерологічної матриці або обидва праймери, проте утворений при цьому продукт має іншу довжину або напрямок елонгації співпадає чи перекривається, оскільки за цих умов пара олігонуклеотидів зберігає свою високу специфічність. У разі можливості утворення продукту неспецифічного відпалу з іншою або тією самою довжиною за умов високої гомології праймерів і гетерологічної матриці необхідно було здійснювати пошук альтернативних олігонуклеотидів, щоб запобігти завідомо неспецифічним реакціям. Проте таку тенденцію ми спостерігали дуже рідко – лише при конструюванні праймерів до матриць з подібними послідовностями, зокрема при створенні олігонуклеотидів для диференціації цирковірусів обох серотипів, які вміщували консервативні ділянки.

Важливим аспектом при глобальній перевірці, на нашу думку, є обрання спектру гетерологічних матриць за якими проводиться перевірка внутрішньовидової специфічності праймерної системи. Для досліджень, пов'язаних з виявленням ДНК (кДНК) вірусів тварин, зберігалася необхідність визначення комплементарності олігонуклеотидів до нуклеїнових кислот хребетних (перехресні реакції з геномною ДНК), людини (відсторонення фактору контамінації зразка ДНК людини), вірусів, бактерій, фагів. У разі необхідності можна було також проводити пошуковий скринінг за ДНК-послідовностями фагів, гризунів і безхребетних.

Проведені в FASTA дослідження олігонуклеотидів ILTV_f/t, якими були ілюстровані попередні етапи аналізу, показали їх високий рівень внутрішньовидової специфічності, оскільки в процесі перевірки не було виявлено жодних перехресних варіантів гібридизації з ДНК людини, ссавців, хребетних, бактерій та інших вірусів за двома праймерами. Гомологія спостерігалась лише по відношенню до ДНК-матриць вірусу ІЛТ.

На підставі проведених аналітичних робіт та їх теоретичного узагальнення були сформульовані принципи розрахунку праймерних послідовностей та перевірки їх якості, яка складалася з підбору перспективних таргетних генів, на

основі знання генетичних та антигенних характеристик патогенів, пошуку консервативних ділянок, їх аналізу щодо наявності ймовірних праймерних пар, дослідження визначених пар за показниками якості з використанням методів мікроаналізу та макроаналізу в режимі on-line (рис. 9).

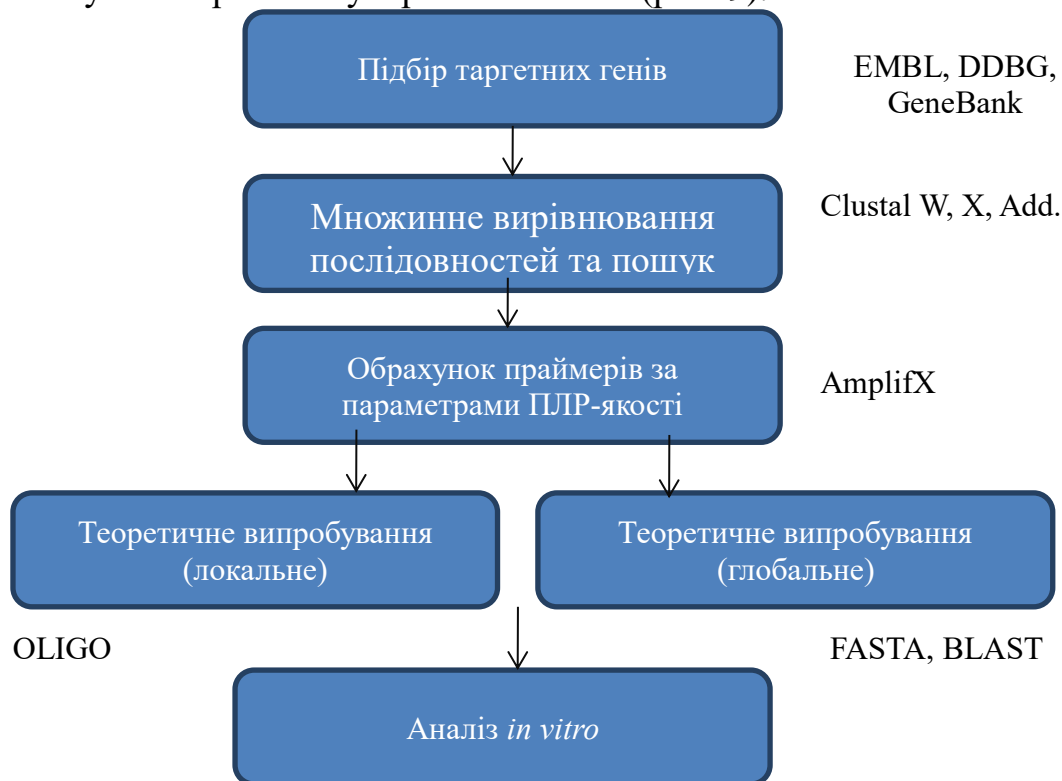


Рис. 9. Схема розробки праймерних систем для детекції патогенів за допомогою ПЛР.

Для обґрунтування ефективності вказаної схеми, що базувалася на використанні локальних програм BioEdit, AmplifX, Oligo Software та on-line-програм BLAST і FASTA, був проведений комплекс досліджень з метою конструювання та теоретичної перевірки якості праймерів для клонування генів gV та pp38 вірусу хвороби Марека, виявлення вірусів грипу А, ідентифікації підтипу H5N1, індикації та генотипування вірусів ньюкаслської хвороби, цирковірусів, вірусу діареї ВРХ, індикації герпесвірусів ІРТ, ІЛТ та хвороби Ауескі – патогенів, що репрезентували різні типи вірусних геномів, мали різні потенціали генотипової мінливості та різний спектр патогенності. Принциповою відмінністю запропонованої системи від існуючих напрацювань було застосування певного комплексу програмних продуктів (BioEdit, AmplifX тощо) та узагальнення теоретичного й практичного позитивного та негативного досвіду попередніх дослідників. Незважаючи на великий обсяг літератури з питання створення праймерів загальної концепції розрахунку та перевірки параметрів їх якості, що могла б слугувати прототипом нашої системи, не існувало. Представлена схема стала продуктом аналітичного огляду фрагментарних даних попередніх досліджень і основним теоретичним фундаментом усіх викладених нижче експериментів зі створення, валідації та апробації методик молекулярно-генетичної індикації та типування збудників хвороб тварин. Її універсальність

розкрито на прикладі методів детекції та диференціації восьми патогенів з п'яти вірусних родин, а також різних бактерійних і паразитарних патогенів.

Певні відмінності складають принципи створення праймерів зондового типу для ПЛР в режимі реального часу. Зокрема, керуючись базовими принципами, що лежать в основі їх роботи в першу чергу важливим є завищений GC-вміст у них, що зумовив би їх тугоплавкість та стимулював генерування імпульсу флуоресценції саме на етапі елонгації, що відповідала б плавленню зонду.

Для обчислення цих праймерів існують спеціалізовані програмні продукти на зразок *Beckon designer*, *Primer Premier*. На сьогодні калькулятори праймерів існують і в он-лайн режимі. Спектр їх можливостей поширюється на дизайн праймерів для класичної ПЛР, праймерів і зондів для ПЛР у режимі реального часу, праймерів для гібридизації та наддовгих праймерів для ізотермальних ПЛР – новітнього напрямку молекулярної діагностики, що на фоні збереження високої чутливості та високої специфічності не потребує значних витрат на устаткування для проведення реакції та детекції її продуктів.

При створенні олігонуклеотидів для ізотермальної ампліфікації існують свої особливості. Зокрема, розробляють 4 типи праймерів (дві пари - зовнішні та внутрішні праймери), які розпізнають 6 послідовностей цільового гена: F3c, F2c і F1c регіони на 3'-кінці та B1, B2 і B3 регіони на 5'-кінці. Внутрішній прямий праймер складається з F2 регіону (на 3'-кінці), комплементарного до F2c регіону, і такої ж послідовності як в F1c регіоні на 5'-кінці. Внутрішній зворотній праймер складається з B2 регіону (на 3'-кінці), комплементарного до B2c регіону, і такої ж послідовності як в B1c регіоні на 5'-кінці. Зовнішній прямий праймер складається з F3 регіону, комплементарного до F3c регіону, а зовнішній зворотній містить B3 регіон, комплементарний до B3c регіону.

Як правило, співвідношення внутрішніх праймерів до зовнішніх складає від 4:1 до 8:1.

Існують також певні особливості в дизайні зондів для ПЛР в форматі реального часу. Зараз зупинимося на дизайні найбільш популярних зондів типу *TaqMan*. При створенні зондів враховують такі параметри: GC-вміст повинен становити 20-80 %, температура плавлення - 68-70 °C. Послідовність зонду не повинна містити однакових нуклеотидів поспіль (особливо G, в ідеалі - не більше 4-х поспіль). Для відпалу обирають той той ланцюг ДНК, на якому в ділянці зонду частіше зустрічатиметься C, ніж G, а на 5'-кінці не повинно бути G взагалі. Найбільш застосовувана флуоресцентна мітка FAM або VIC, а в якості гасника використовують найпоширеніший і найдешевший - TAMRA, або більш ефективний BHQ1 (Blackhole).

Якість зонду при дизайні важливіша за якість праймерів, тому починати потрібно саме з підбору послідовності зонду. Температура плавлення його повинна бути приблизно на 10 °C вище за температуру плавлення праймерів.

При використанні двох зондів при мультиплексній детекції, наприклад пари FAM/BHQ1 + VIC/BHQ1 також є оптимальною. При використанні інших міток, можливо, знадобляться інші гасителі флуоресценції.

MGB-зонди компанії Applied biosystems, крім мітки та гасника, несуть також групу, що зв'язується з малою доріжкою ДНК (Minor Groove Binder). У результаті підвищується температура плавлення зонду та зростає його стабільність при взаємодії з ампліконом. Проте коштують такі зонди приблизно вдвічі дорожче за стандартні TaqMan-зонди.

Оптимізація ПЛР-протоколів

Вплив регламенту застосування олігонуклеотидів та інших компонентів суміші на чутливість і специфічність реакції є не менш критичним аспектом за якість проведених біоінформатичних розрахунків.

Питання створення та оптимізації ПЛР-протоколів тісно пов'язані з термодинамікою реакції та кінетикою ампліфікації. Накопичення ДНК-продукту в ПЛР базується на повторюваній ферментній реакції, що супроводжується зростанням концентрації продукту зі збільшенням числа циклів. ПЛР-продукт попереднього етапу являє собою субстрат для подальшої реакції. Концентрація збільшується вдвічі при кожному повторенні. З літературних джерел відомо, що практична ефективність ампліфікаційних циклів ніколи не досягає 100 %. Вже з 5-го ампліфікаційного циклу спостерігається тенденція до відхилення ефективності реального накопичення концентрації амплікону від ідеального, що залежить від численних факторів: об'єму проби, активності полімерази, термальних величин, концентрації іонів магнію, дНТФ та праймерів (рис. 10).

Оптимізацію протоколу проводять за такими параметрами, як температура відпалу праймерів (теоретична та фактична), концентрація основних компонентів реакційної суміші та об'єм проби, що вноситься.

На першій стадії оптимізації ПЛР-протоколу визначають теоретичну температуру відпалу (гібридизації) T_{an} пар за формулою (1).

$$T_{an} = 0,3 T_m + 28,7(\% G + \% C) - 472,5/N + 27 \quad (1),$$

де T_m – температура плавлення олігонуклеотидів (величина, що автоматично розраховується програмою), $(\% G + \% C)$ – вміст гуаніну та цитозину, N – довжина продукту ПЛР (рис. 11).

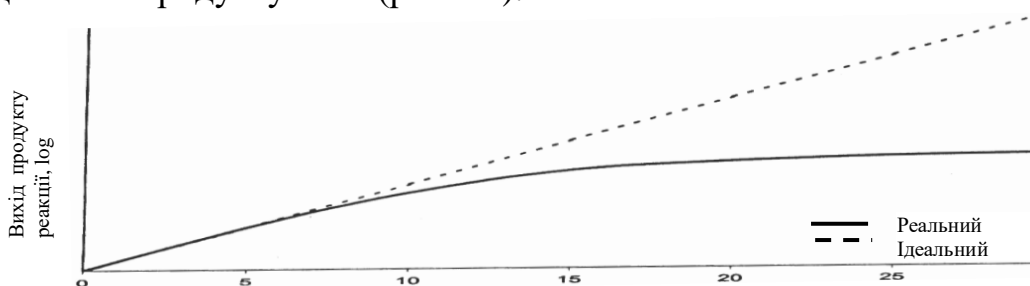


Рис. 10. Динаміка утворення ПЛР-продукту при різних кількостях ампліфікаційних циклів.

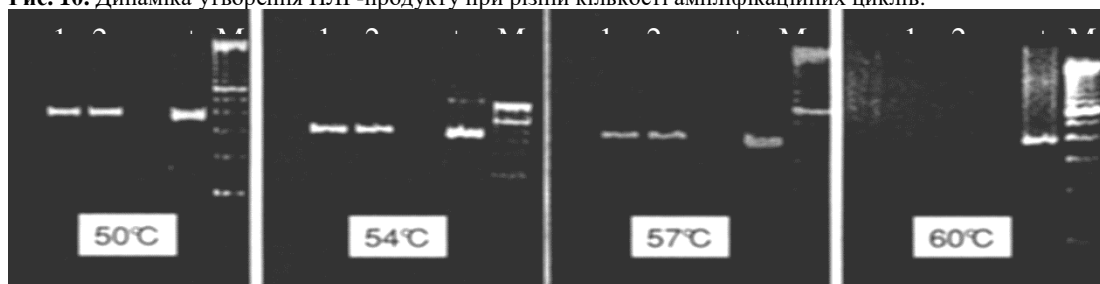


Рис. 11. Вплив температури відпалу на специфічність ампліфікації:

1 та 2 – хібнопозитивні проби, «-» – негативний контроль, «+» – позитивний контроль, М – маркер молекулярної ваги. Специфічність властива ампліфікації з температурою відпалу праймерів 60 °С .

Далі проводять реакцію за базовими умовами (праймери у стоковій (маточній, початковій) концентрації за умови різної кількості ампліфікаційних циклів, користуючись базовими наборами реагентів Мастер-міксу з вмістом іонів магнію – 1,5 мМ/мл, за температури менше та більше теоретичного значення. Більшість авторів методик вважає оптимальними ті межі температур, які дозволяють отримати фрагменти специфічної довжини, тобто тотожної до розрахованого показника за маркерами молекулярної ваги.

Далі показники реакції прийнято оптимізувати за вмістом іонів магнію, кількістю циклів, вмістом полімерази та об'ємом реакції. Ці параметри значно варіюють при застосуванні різних базових компонентів, що спонукає дослідників проводити оптимізацію ще й за маркою реагентів, що використовуються.

Неабияку роль при оптимізації методики виявлення патогенів відіграє кількість зразка для проведення досліджень. Звичайною практикою є застосування ДНК (РНК) екстрактів у об'ємах від 2 до 10 мкл, що вміщують середню кількість нуклеїнової кислоти збудника, адекватну до клінічних зразків. Як оптимальну обирають ту кількість зразка, яка забезпечує утворення максимально контрастної смуги специфічної довжини за відсутності неспецифічних шлейфів і смуг.

Валідація – встановлення відповідності результатів аналізу очікуваним показникам або визначення вірогідності методики є обов'язковою частиною її створення, що передує впровадженню тесту в практику. По відношенню до молекулярно-генетичних тестів процес встановлення валідаційних параметрів регламентується Chapter I.1.4. Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases // Manual Of Diagnostic Tests And Vaccines For Terrestrial Animals.

Валідаційні процедури щодо ПЛР-тестів проводяться в три етапи. Перший охоплює накопичення та статистичну обробку даних щодо реалізації тесту (feasibility). Другий стосується власне розробки та стандартизації методики за показниками чутливості (аналітичної та діагностичної), специфічності (діагностичної та внутрішньовидової), відтворюваності, лінійності. На заключному етапі валідації здійснюють визначення таких параметрів, як діагностична специфічність і чутливість, відтворюваність та повторюваність тесту.

Вимоги ж до вивчення чутливості та специфічності викладено в Chapter I.1.3, де наведено регламентацію стосовно валідації інших діагностичних тестів. Цей розділ згідно рекомендацій МЕБ висвітлює порядок відбору зразків, який охоплює панель, що формується з позитивних (до 300) і негативних (до 1000) проб. За їх аналізом встановлюють аналітичну чутливість (мінімальну кількість нуклеїнової кислоти, що виявляється, за титром збудника або в абсолютних одиницях – геном-еквівалентах, г.е.) і діагностичну чутливість методики (у порівнянні до рекомендованого Кодексом МЕБ тесту). Діагностичну специфічність визначають у порівнянні до цього ж протоколу, у той час, як внутрішньовидову специфічність (неспроможність до реакції з гетерологічними зразками ДНК чи РНК) досліджують на панелі гетерологічних зразків.

Відтворюваність і повторюваність визначають при дослідженні тих самих панелей зразків різними операторами (відтворюваність) або, в принаймні, трьох повторях (повторюваність).

Тест, що пройшов валідацію, може бути наданий для акредитації до Міжнародного епізоотичного бюро, після чого він має пройти клінічні випробування та стандартизуватись двічі на рік з референс-панелями.

Завершуючи огляд проблеми оптимізації та валідації протоколів ампліфікації, необхідно звернути увагу на так звані контрастуючі (оптимізуючі) субстанції. Додавання речовин, що збільшують специфічність або підвищують вихід ПЛР-продукту, може дозволити істотно покращити діагностичну ефективність запропонованих протоколів. Проте існує загроза й негативного їх впливу, що пояснюється природою їх дії, тобто змінами характеру взаємодії праймерів і матриці. До числа таких субстанцій відносять натрієву сіль бетаїну, диметилсульфоксид (DMSO), бичачий сироватковий альбумін (BSA) тощо (табл. 3).

Інші ампліфікаційні методи аналізу нуклеїнових кислот

На сьогодні ПЛР у класичному форматі поступово стає все менш вживаним методом, який здебільшого використовують з метою ампліфікації фрагментів донорських ДНК-послідовностей для генно-інженерних маніпуляцій, варіабельних ділянок та бібліотек ДНК для секвенування та інших методів поглибленого аналізу.

На зміну цьому формату приходить ПЛР у режимі реального часу. Полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу – метод, заснований на ампліфікації (примноженні кількості) копій ДНК-послідовностей-аналітів за допомогою олігонуклеотидних праймерів (затравок, стартерів реакції), індукованій ферментом *Taq*-полімеразою. Інтенсивність утворення копій обліковується автоматично завдяки утворюваному флуоресцентному сигналу зондів, компліментарних матриці-аналіту.

Існує декілька різновидів цього аналізу, зокрема:

- якісна,
- мультиплексна та
- кількісна ПЛР-РЧ.

Таблиця 3

Речовини, що підвищують специфічність та/або вихід ПЛР-продукту (за «Kovarova M., Draber P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Res* 2000 Jul 1;28(13):E70»)

Речовина	Матрична концентрація	Робочі концентрації	Механізм дії
Ацетамід (Acetamide)	25 %	~5 %	Підвищення розчинності
Натрійова сіль бетаїну (Betain Na)	5 моль	0,5–2 моль (оптимально ~1.6 моль)	стабілізація полімераз і ревертаз, зниження T_m ДНК, вирівнювання T_m АТ- и GC-збагачених послідовностей

Бичачий сироватковий альбумін (BSA)	10 мг/мл	~0,1 мг/мл	стабілізація ферментів
Диметилсульфоксид (DMSO)	100 %	2,0–15 % (оптимально ~5 %)	підвищення розчинності
Формаїд (Formamid)	100 %	1–5 %	стабілізація ферментів
Гліцерол (Glycerol)	100 %	5–20 % (оптимально 10–15 %)	стабілізація ферментів
NP-40, Твін-20 (Tween 20), Тритон X-100 (Triton X-100)	10 %	0,1–0,5 % (покращує seq. PCR)	стабілізація ферментів
ПЕГ-8000 (PEG 8000)	40 %	5–20 % (оптимально – 15 %)	підвищення ефективної концентрації
Тетраметиленамонію хлорид (Tetramethylammonium chloride (TMA chloride))	5 моль	0,01–0,1 ммоль	збільшення специфічності
Термостабільна пірофосфатаза (<i>Pyrophosphatase thermostable</i>)	5 ОД/мкл	0,001–1 ОД/реакцію	розпад пірофосфатів, які можуть блокувати реакцію полімеризації
ssDNA binding protein <i>E. coli</i>	500 мкг/мл	5 мкг/мл	стабілізація односпіральної ДНК
ssDNA binding protein T4 gene 32 protein	500 мкг/мл	Покращує вихід при концентрації 0,5–1,0 ммоль.	стабілізація односпіральної ДНК

Умовно використовувані при цьому платформи детекції ПЛР-продуктів можна поділити на дві групи:

- а) ПЛР-РЧ з використанням інтеркалюючих барвників та
- б) ПЛР-РЧ на основі використання TaqMan- та інших зондів (рис. 12).

Сутність першої групи полягає у використанні флюоресцентних інтеркалюючих барвників, що здатні встроюватись до дволанцюгових метекул ДНК з генерацією флюоресцентного сигналу, який враховується інструментально. Як приклад барвника можна навести використання SYBR-Green.

При його вбудовування у дволанцюгові ДНК на етапі елонгації утворюється флюоресцентний сугнал у зеленій зоні спектру, який враховується інструментально у режимі реального часу чи в кінці реакції (детекція за кінцевою точкою). Інтенсивність флюоресцентного сигналу корелює з динамікою утвореного продукту реакції. Проте, ці методи поступаються за специфічністю використанню флюоресцентно мічених ДНК-зондів, оскільки інтеркалюючі барвники генерують сигнал, зв'язуючись з будь-якими дволанцюговими ДНК (хибний фоновий сигнал дають геномні та контамінуючі нуклеїнові кислоти з дволанцюговою будовою).

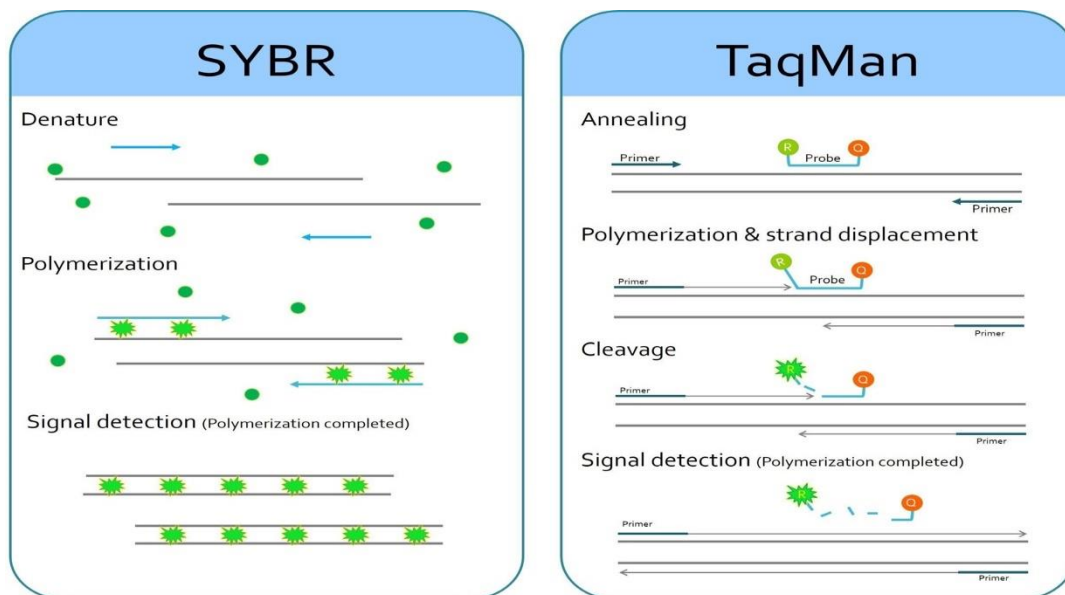


Рис. 12. Схеми ПЛР-РЧ з використанням платформ SYBR-Green та TaqMan зондів.

Система ПЛР у реальному часі заснована на виявленні та кількісному визначенні флюоресцентного сигналу, що генерується флюоресцентною міткою, яку вміщує специфічний ДНК зонд під час взаємодії останнього з полімеразою під час етапу елонгації (Lee, 1993; Livak, 1995). Цей сигнал збільшується прямо пропорційно кількості продукту ПЛР в реакції. Фіксуючи інтенсивність флюоресценції на кожному циклі, можна контролювати реакцію під час експоненційної фази, коли перше значне збільшення кількості продукту ПЛР корелює з початковою кількістю цільової матриці. Чим вище початкова кількість копій гена-мішені, тим швидше спостерігається значне збільшення флюоресценції. Значне збільшення флюоресценції вище базового значення, виміряне протягом 3-15 циклів, свідчить про утворення і накопичення продукту ПЛР.

Фіксований поріг флюоресценції встановлюється значно вище базової лінії, яку може змінити оператор. Параметр C_t (пороговий цикл) визначається як номер циклу, при якому рівень флюоресценції перевищує пороговий.

Існують декілька систем обліку флюоресценції для ампліфікації ДНК: 1) гідролізні зонди, 2) гібридизаційні зонди і 3) інтеркалюючі барвники, як вже говорилося вище.

Основні типи зондів для ПЛР в режимі реального часу наведено на рисунку 13. Зонди TaqMan — це олігонуклеотиди, довщі, ніж праймери (довжина 20-30 п.н. із значенням T_m на 10 °C вище), які містять флюоресцентний барвник на 5'-кінці і гаситель флюоресценції (зазвичай TAMRA або нефлюоресцентний гаситель (NFQ) на 3'-кінці.

Збуджений флюоресцентний барвник спершу генерує світловий сигнал, а потім передає енергію сусідній молекулі гасника, внаслідок чого сигнал зникає. Таким чином, безпосередня близькість барвника (репортера) і гасника запобігає випромінюванню будь-якої флюоресценції, поки зонд не пошкоджений. Зонди TaqMan гібридизуються з внутрішньою областю продукту ПЛР.

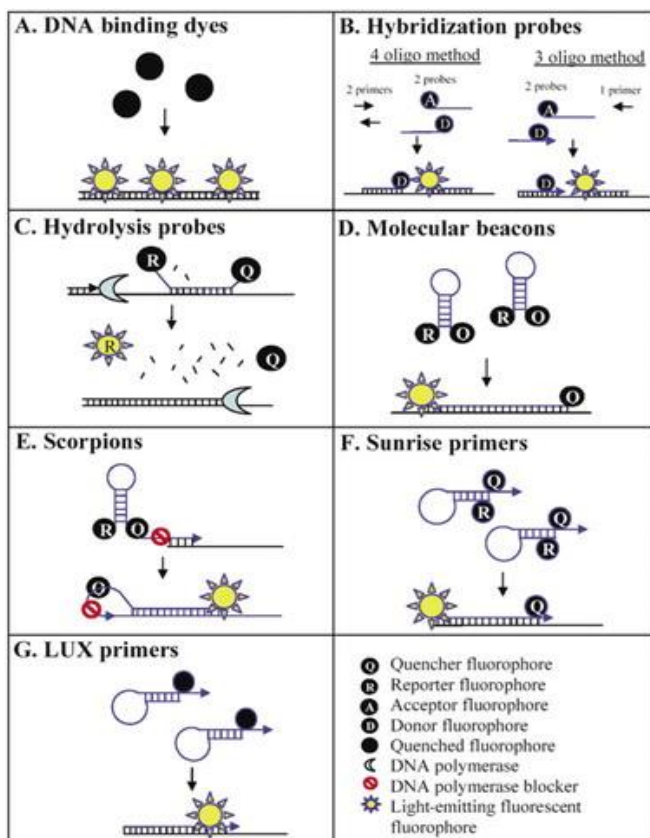


Рис. 13. Типи зондів для ПЛР-РЧ.

Оскільки флуоресцентний сигнал генерується лише в тому випадку, якщо зонд гібридується з ДНК-мішенню, відбувається специфічне посилення сигналу флуоресценції з кожним наступним циклом, пропорційно до зростання числа копій таргетної ДНК. Процес гібридизації та розщеплення не заважає експоненційному накопиченню продукту. Однією з особливих вимог до флуорогенних зондів є відсутність G на 5' кінці. Наявність G-залишків поруч із репортерним флуоресцентним барвником гасить репортерну флуоресценцію навіть після розщеплення. Ефективно сконструйовані зонди TaqMan потребують незначної оптимізації протоколу.

До переваг ПЛР у режимі реального часу відносять:

- високу чутливість та специфічність;
- нижчий за класичну ПЛР ризик контамінації;
- швидкість виконання (аналіз триває на 1-2 год. менше, ніж класична ПЛР);
- низьку трудомісткість;
- придатність для кількісного аналізу;
- придатність до використання в мультиплексному форматі (виявлення кількох збудників чи кількох генетичних маркерів одночасно).

Однак, цей тип ПЛР не позбавлений і недоліків, до числа яких входять:

- потреба у коштовному обладнанні та більш дорогих реагентах;
- для дизайну зондів потрібно чітко знати послідовність таргетних ділянок ампліфікації;
- можливість утворення артефактного сигналу при використанні інтеркалюючих барвників;
- висока чутливість до дії інгібіторів реакції.

Коли полімераза реплікує ланцюг ДНК-матриці, на якому гібридизований TaqMan-зонд, 5' екзонуклеаза активність розщеплює 5' кінець зонда, який містить репортерний барвник. Це припиняє дію гасника і репортерний барвник починає випромінювати флуоресценцію, яка збільшується в кожному циклі пропорційно швидкості розщеплення зонда. Накопичення продуктів ПЛР виявляють шляхом моніторингу збільшення флуоресценції репортерного барвника.

За ПЛР-аналізу з використанням зондів типу TaqMan використовуються універсальні параметри теплового циклу та інші умови реакції.

Методи ізотермальної ампліфікації

Методи ізотермальної ампліфікації РНК.

До числа ампліфікаційних методів детекції генетичних матеріалів відносять також транскрипційні методи, зокрема, ампліфікація, заснована на нуклеотидній послідовності нуклеїнової кислоти (NASBA) та транскриптазоіндукована ампліфікація (ТМА). Ці методи засновані на ампліфікації (примноженні кількості) копій РНК-послідовностей, транскрибованих з кДНК-матриць-аналітів за допомогою зворотної транскриптази, Н-РНКаз (у NASBA) та Т7-РНК-полімерази з визначенням отриманих продуктів методами РЧ-ПЛР або гель-електрофорезу (рис. 14).

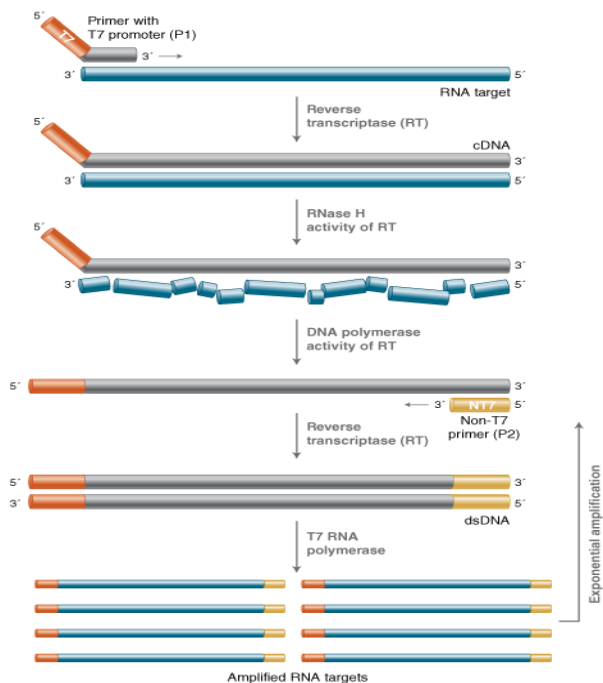


Рис. 14. Схеми NASBA.

У даному огляді викладено принцип та основні етапи методу NASBA, наведено приклади його застосування в діагностичній мікробіології, а також дана порівняльна характеристика методу NASBA та інших методів ампліфікації нуклеїнових кислот, таких як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та зворотно-транскриптазна ПЛР (PN-ПЛР).

До переваг ізотермічної ампліфікації РНК відносять:

- належну чутливість та специфічність;
- швидку реалізацію (тест є швидшим за ПЛР);
- можливість мультиплексного застосування;
- підходить для кількісного аналізу та генотипування;
- проходить в умовах 41 С та не потребує специфічного високовартісного обладнання.

Метод NASBA не позбавлений і недоліків

- процес отримання та зберігання РНК для дослідження потребують належного виконання та суворого дотримання умов, оскільки якість РНК для дослідження критично важлива;

Метод ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) знаходить дедалі ширше застосування у діагностичній молекулярній мікробіології, зокрема, при діагностиці інфекцій у вагітних жінок та новонароджених дітей.

Метод NASBA має унікальну здатність вибірково ампліфікувати специфічну послідовність РНК у присутності ідентичної послідовності ДНК, що визначає основні сфери його застосування: діагностика РНК-вірусів, вивчення експресії бактеріальних і вірусних генів, діагностика бактеріальних інфекцій, заснована на виявленні 16S рРНК.

- у аналізі використовуються високоякісні ферменти, які до того ж є термолабільними;
- низька температура проведення реакції зумовлює ризики неспецифічних реакцій.

Методи ізотермальної ампліфікації ДНК.

Петльова ізотермічна ампліфікація (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) – це метод ампліфікації ДНК у одній пробірці. LAMP дозволяє проводити молекулярну діагностику істотно швидше і дешевше порівняно з ПЛР. Для детекції РНК-вірусів LAMP можна поєднувати з етапом зворотної транскрипції.

LAMP – ізотермічний метод ампліфікації нуклеїнових кислот. На відміну від ПЛР він не вимагає постійної зміни температурних циклів, реакція протікає при постійній температурі, що забезпечує високу ефективність ампліфікації (ДНК ампліфікується 10^9 - 10^{10} разів за 15-60 хвилин) (рис. 15). Незмінна температура також дозволяє уникнути необхідності використання ампліфікаторів.

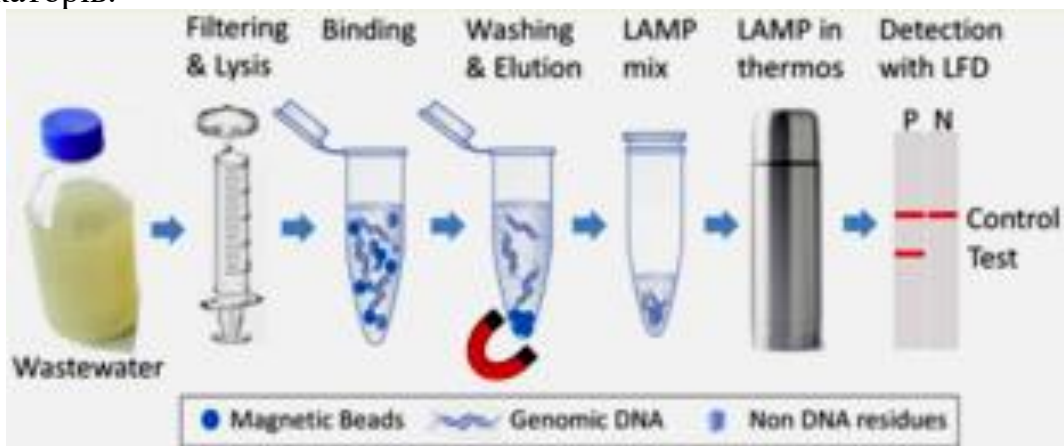


Рис. 15. Схема LAMP.

До переваг ізотермальної ампліфікації належать:

- належна чутливість та специфічність;
- простота виконання та швидкість;
- метод не потребує особливого обладнання;
- метод мало чутливий до інгібіторів;
- та підходить для генотипування та кількісного аналізу.

До недоліків реакції відносяться наступні фактори:

- методика потребує використання 6 праймерів у реакції;
- існує високий ризик контамінації;
- візуальна детекція може носити суб'єктивний характер;
- методика не придатна для дизайну мультиплексних методів детекції ДНК.

6. Практичні аспекти ампліфікаційних методів аналізу

Організація роботи діагностичних ПЛР-лабораторій

Накопичений дотепер досвід роботи лабораторій, що використовують полімеразну ланцюгову реакцію для детекції збудників інфекційних захворювань, дозволяє сформулювати основні вимоги щодо організації роботи цих діагностичних підрозділів і проведення аналізів.

Згідно з основними етапами генодіагностики лабораторію, призначену для проведення ПЛР, розділяють на три (у разі класичної ПЛР – чотири) зони (приміщення):

- передзона – для прийому, реєстрації, сортування та первинної обробки матеріалу (об'єднання або поділ проб, центрифугування, інактивація тощо). У цьому приміщенні можна готувати проби для проведення інших досліджень (бактеріологічних, вірусологічних, серологічних);

- зона I – підготовка реакційних сумішей (у цій зоні не допускається проведення досліджень з жодними біологічними матрицями або ДНК- та РНК-екстрактами з них);

- зона II – виділення ДНК або РНК з клінічного матеріалу та культур клітин;

- зона III – для проведення реакції ампліфікації (ПЛР, ЗТ-ПЛР). У цьому приміщенні не можна проводити інші види робіт з інфекційними агентами (мікробіологічний аналіз, ІФА, інші діагностичні тести), ПЛР-діагностика яких проводиться в даній лабораторії, а також дослідження з використанням культуральних (накопичення патогенних біологічних агентів) та генно-інженерних методів, у тому числі пов'язаних з отриманням (клонуванням) і виділенням рекомбінантних плазмід;

- зона IV (у разі використання електрофоретичних методів аналізу) – для візуалізації та аналізу результатів ампліфікації. У цьому приміщенні можна використовувати інші методи детекції інфекційних збудників, виявлення яких проводиться в цій лабораторії.

З метою запобігання контамінації, пов'язаної з випадковим перенесенням ампліконів із зони електрофоретичного аналізу до зони ампліфікації, треба виключити можливість створення повітряного потоку із приміщення для візуалізації та аналізу результатів ампліфікації до приміщення для проведення реакції зворотної транскрипції та ПЛР. Слід розташувати ці приміщення якомога далі одне від одного та організувати роботу так, щоб переміщення відбувалось в одному напрямку – від зони ампліфікації (III) до зони електрофоретичного аналізу (IV).

Необхідно також повністю виключити ймовірні механічні чи інші джерела і фактори контамінації зони I від передзони чи зони екстракції та ампліфікації.

Передзона може бути поєднана з зоною екстракції. Одночасно й екстракція РНК та ДНК може відбуватися в умовах бактеріологічних і вірусологічних лабораторій. При цьому мають бути дотримані вимоги біобезпеки та біозахисту на мінімальному необхідному рівні в залежності від групи патогенності збудника-аналіту.

За необхідності працювати в лабораторії лише з ПЛР у режимі реального часу приміщення для проведення електрофорезу стає обов'язковим.

Персонал, який працює в ПЛР-діагностичній лабораторії, повинен пройти відповідне навчання та інструктаж. Бажано, щоб у кожному приміщенні ПЛР-лабораторії працювали різні співробітники, тобто один і той же співробітник не може бути задіяний на різних етапах роботи в один і той же день.

У кожній зоні ПЛР-лабораторії повинен бути свій відповідно маркований набір реагентів, автоматичних піпеток (дозаторів), штативів, наконечників, пластикового та скляного посуду, лабораторного обладнання, медичних інструментів, халатів, медичних головних уборів, гумових рукавичок, взуття, які забороняється виносити до інших приміщень ПЛР-лабораторії та використовувати для проведення інших видів досліджень. При цьому необхідно, щоб кожний співробітник ПЛР-лабораторії мав персональний набір автоматичних піпеток, реагентів, одягу. Робочий одяг з кожного приміщення ПЛР-лабораторії треба обробляти окремо.

Підтримка чистоти на робочому місці є необхідною умовою запобігання контамінації. Тому кожне приміщення лабораторії повинно мати окремий набір інвентарю для обробки робочого місця (ватно-марлеві тампони, пінцет, 70 %-ий етанол, дезінфікуючий розчин тощо) та прибирання приміщення, а також джерела ультрафіолетового випромінювання, які ефективно інактивують ДНК-матриці (кДНК). Також зручно користуватися додатковим переносним ультрафіолетовим бактерицидним опромінювачем.

Робочі поверхні лабораторних столів повинні бути виготовлені з матеріалів, стійких до дії миючих і дезінфікуючих засобів, не мати тріщин і швів. Для захисту робочих столів від прямих сонячних променів використовують світлозахисні плівки; використання жалюзі не рекомендується через адсорбцію пилу на їх поверхні. Приміщення ПЛР-лабораторії бажано покрити кахлем (підлогу, стіни) або олійною фарбою (стіни, стелю), сталою до дії миючих і дезінфікуючих засобів.

Робочі поверхні та обладнання усіх приміщень (зон) ПЛР-лабораторії треба опромінювати ультрафіолетовим світлом з максимумом випромінювання в області 260 нм протягом 1 години до початку та після завершення роботи, обробляти дезінфікуючим розчином (вказаним для конкретного виду збудника), а потім етиловим спиртом.

При проведенні ПЛР-аналізу пластиковий посуд і наконечники для автоматичних піпеток (дозаторів) використовують одноразово та обов'язково замінюють при переході від однієї проби до іншої для запобігання перехресної контамінації при екстракції ДНК (РНК), внесенні реакційної суміші та клінічних зразків у пробірки для ампліфікації, внесенні ампліконів до лунок агарозного гелю при проведенні електрофорезу. Причому при обробці клінічних зразків або внесенні ДНК (РНК) у пробірку для проведення реакції використовують наконечники з аерозольним бар'єром (або з ватними фільтрами, виготовленими в приміщенні, де не працюють з ДНК (РНК)).

На всіх етапах проведення ПЛР-аналізу слід працювати в гумових рукавичках, які використовують одноразово, а після закінчення роботи руки необхідно ретельно мити з милом та обробляти дезінфікуючим розчином.

Кожне приміщення ПЛР-лабораторії повинно бути укомплектоване мінімально необхідними для проведення молекулярно-генетичних досліджень обладнанням і витратними матеріалами, приблизний перелік яких для кожної зони наведено нижче:

1. Передзона:

- бактерицидна лампа;
- холодильник побутовий, що підтримує температуру до мінус 20 °С;
- дистильатор;
- сухоповітряний термостат (використовувати водяні бані не рекомендується, оскільки вода, яка їх заповнює – це потенціально джерело контамінації);
- штативи для пластикових мікропробірок і скляних пробірок;
- посуд лабораторний скляний та пластикові мікропробірки об'ємом 0,5–1,5 мл;
- медичні інструменти;
- контейнери для транспортування клінічного матеріалу;
- контейнер з дезінфікуючим розчином.

2. Зона I:

- бактерицидна лампа;
- холодильник побутовий, що підтримує температуру до мінус 20 (мінус 70) °С;
- штативи для пластикових мікропробірок і скляних пробірок;
- посуд лабораторний скляний та пластикові мікропробірки об'ємом 0,5–1,5 мл;
- контейнер з дезінфікуючим розчином.

3. Зона II:

- настільний бокс з бактерицидною лампою;
- мікроцентрифуга для пластикових пробірок зі швидкістю обертання ротору від 1 тис. об./хв до 14 тис. об./хв;
- мікроцентрифуга-струшувач для перемішування вмісту мікропробірок;
- термостат для пластикових пробірок об'ємом 0,5 та 1,5 мл, що забезпечує температуру від 0 °С до 120 °С ($\pm 0,5$ °С);
- сухоповітряний термостат;
- холодильник побутовий, що підтримує температуру до мінус 20 °С;
- штативи для автоматичних піпеток (дозаторів);
- штативи для пластикових мікропробірок і скляних пробірок;
- штативи для наконечників для автоматичних піпеток (дозаторів);
- автоматичні піпетки (дозатори) з регульованим об'ємом дози ДПОП-0,5-100-1000 мкл;
- наконечники з аерозольним фільтром для автоматичних піпеток (дозаторів);
- вакуумний насос;
- колба-пастка;

- посуд лабораторний скляний та пластикові мікропробірки об'ємом 0,5–1,5 мл;
- медичні інструменти;
- контейнер з дезінфікуючим розчином.

4. Зона III:

- настільний бокс з бактерицидною лампою;
- ампліфікатор;
- охолоджувач проб;
- холодильник побутовий;
- бідистилятор;
- штативи для автоматичних піпеток (дозаторів);
- штативи для пластикових мікропробірок;
- штативи для наконечників для автоматичних піпеток (дозаторів);
- автоматичні піпетки (дозатори) з регульованим об'ємом дози ДПОП-0,5-100-1000 мкл;
- наконечники з аерозольним фільтром для автоматичних піпеток (дозаторів);
- пластикові мікропробірки об'ємом 0,5–1,5 мл;
- контейнер з дезінфікуючим розчином.

5. Зона IV (у разі реалізації електрофоретичних методів):

- бактерицидна лампа;
- камера для горизонтального електрофорезу;
- джерело постійного струму;
- ультрафіолетовий транслюмінатор;
- відеосистема з цифровою відеокамерою або фотоапарат з плівкою «Мікрат 300»;
- штативи для автоматичних піпеток (дозаторів);
- штативи для пластикових мікропробірок;
- автоматичні піпетки (дозатори) з регульованим об'ємом дози ДПОП-0,5-100 мкл;
- наконечники для автоматичних піпеток (дозаторів);
- пластикові мікропробірки об'ємом 0,5–1,5 мл;
- терези лабораторні;
- посуд лабораторний скляний;
- мікрохвильова піч для приготування агарозного гелю;
- медичні інструменти;
- контейнер з дезінфікуючим розчином.

Загальні підходи щодо підготовки зразків

Матеріалом для дослідження в ПЛР є нуклеїнові кислоти, отже, далі піде мова про підготовку матеріалу до аналізу – екстракцію нуклеїнових кислот.

Екстракція неушкоджених ДНК та РНК є ключовим моментом забезпечення високої якості результатів ПЛР. Виділення нуклеїнових кислот поганої якості або виділення їх разом з інгібіторами полімерази може призвести до хибно негативних результатів.

У сучасній літературі описано чимало методів екстракції нуклеїнових кислот, які відповідають потребам досліджень, дозволяючи отримувати препарати відповідної якості.

Є способи, орієнтовані на екстракцію лише РНК, лише ДНК, окремо вірусних нуклеїнових кислот та окремо еукаріотичних геномних ДНК.

За допомогою ПЛР можливо достатньо просто проводити ампліфікацію й аналіз ДНК. Однак постановка реакції вимагає достатню якість похідного матеріалу, тобто ДНК (кДНК) та РНК. Тому першим етапом постановки будь-якої модифікації ПЛР є отримання суспензії чистих нуклеїнових кислот задовільної якості.

На сьогодні для різних варіантів екстракції ДНК та РНК запропоновано комерційні набори, що базуються на так званій сорбентній екстракції. Вона передбачає руйнування сполучнотканинних, клітинних і білкових елементів за допомогою лізуючого розчину, накопичення НК на полісахаридному сорбенті, кількаразове відмивання етиловим спиртом різних концентрацій та органічними розчинниками з наступним елююванням НК водою або іншими елюентами. Як правило, такий спосіб екстракції лежить в основі комерційних наборів для виділення сумарної НК, які присутні на ринку України та імпортуються з ряду зарубіжних країн та вітчизняними виробниками.

Сукупність комерційних тест-систем для екстракції, заснованих на сорбентному методі можна умовно поділити на декілька груп. Силікагелеві сорбенти представлені в них у вигляді колонкових мембран (дозволяють проводити елективну, селективну та більш чисту сорбцію), а також у вигляді суспензійних форм. Як альтернатива їм існує низка способів магнітної сорбції.

Зазначені набори існують як у пробірковому (для дослідження індивідуальних зразків), так і в планшетному (для групової екстракції) варіантах.

Крім комерційних наборів є чимало широко застосовуваних методів, вживання яких є найбільш доцільним при дослідженні великих кількостей проб. Оскільки ці методики екстракції при підготовці матеріалу до ампліфікації ДНК (РНК) різних збудників інфекційних та інвазійних хвороб є у більшості своїй універсальними, то немає сенсу в їх докладному описі.

У попередні роки нами було розроблено два способи універсальної екстракції РНК та ДНК. Перший з них розрахований на дослідження щільних матеріалів які містять багато сполучнотканинних елементів (кістки, тканини комах, тканини рослин), а другий – для екстракції ДНК та РНК збудників інфекцій та інвазій, а також геномної еукаріот з біологічних рідин, клітинних суспензій та м'яких тканин.

В основі першого методу лежить лізис клітин бромистим цетилтриметиламонієм, що дозволяє провести руйнування високо-молекулярних полісахаридів і білкових субстанцій на належному рівні. При цьому досягається розщеплення хітинових остовів клітин комах та інших членистоногих, що робить спосіб придатним, як для дослідження геномних ДНК еукаріот, так і для моніторингу щодо наявності збудників трансмісивних інфекцій у тілах комах і кліщів. За дослідження цим способом рослинних матеріалів відбувається ефективне розщеплення клітковини та білків, що дозволяє аналізувати геном

рослин як з точки зору наявності чи відсутності тих чи інших генетичних маркерів, так і наявності маркерів генетичних змін в аспекті контролю поширення ГМО.

Після лізису методика передбачає сорбцію ДНК та РНК на діоксиді кремнію у вигляді суспензії або іммобілізованому на мембрані колонок, дворазове відмивання діоксиду кремнію 70 % етанолом, фінальне відмивання розчином, що містить хлороформ, і елюцію ДНК та РНК до розчину з низькою іонною силою.

Інша методика, яка призначена для дослідження біоматеріалів від хребетних, а також об'єктів довкілля та чистих культур мікроорганізмів, передбачає лізис клітин гуанідином тіоціонатом у присутності Triton X-100, сорбцію ДНК та РНК на суспензійній або іммобілізований діоксид кремнію, відмивання діоксиду кремнію розчином гуанідину тіоціонату, дворазове відмивання сорбованого комплексу 70 % етанолом, фінальне відмивання розчином, що містить хлороформ, і елюцію нуклеїнових кислот до розчину з низькою іонною силою. У залежності від виду матеріалу та його хімічного складу на етапі лізису додатково можуть бути застосовані препарати лізоциму, трипсину, а також протеїнази К.

Виділені екстракти можна відразу застосувати для дослідження методом ПЛР, або деякий час зберігати. Зокрема препарати ДНК можуть зберігатися за температури мінус 20 °С впродовж тривалого періоду (до одного року), а також нормально переживають кількаразове заморожування та відтавання. РНК на відміну від ДНК є надзвичайно нестійкими, а при заморожуванні в умовах мінус 20 °С піддаються руйнуванню внаслідок утворення великогілкових кристалів води. Отже, РНК екстракти допустимо зберігати за температури 4 °С (тобто без розморожування) впродовж 2–3 діб або за температури мінус 70 °С. Ще одним ефективним способом запобігання руйнуванню РНК є створення її «ДНК-відбитку» – комплементарної ДНК (кДНК), яка лишається придатною для аналізу при заморожуванні за температури мінус 20 °С і подальшого зберігання впродовж одного місяця.

Окрім перелічених методів ізолювання нуклеїнових кислот дедалі ширшої популярності набувають так звані інструментальні методи екстракції нуклеїнових кислот. Вони мають у своїй основі принцип полярної сорбції нуклеїнових кислот на твердій фазі. Остання може бути диспергована (силіка, або магнітні кульки) або іммобілізована (силіка нанесена на мембрану).

На сьогодні роботи з екстракції нуклеїнових кислот проводяться вручну, або автоматично. Для одночасної обробки різної кількості зразків в більшості наукових центрів світу успішно використовуються роботи, для яких основними виробниками продуктів та інструментів для молекулярно-генетичних досліджень виготовляються спеціалізовані набори реагентів.

Зворотна транскрипція є обов'язковим попереднім кроком при постановці зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) для детекції інфекційних агентів, що містять РНК, а також з метою вивчення функціональних особливостей та активності генів мікро- та макроорганізмів (дослідження експресії).

Проведення ЗТ-ПЛР-аналізу базується на виконанні трьох основних етапів: реакції зворотної транскрипції на основі вірусної РНК для отримання кДНК, ПЛР для ампліфікації отриманої матриці вірусної, бактерійної чи еукаріотичної кДНК та електрофорезу в агарозному гелі для детекції ампліфікованої ДНК. У випадку постановки ПЛР у режимі реального часу останній етап замінює флуоресцентна детекція продуктів ПЛР впродовж елонгації в кожному циклі. Для досягнення максимальної чутливості виявлення патогенів вірусної природи у зразках, що аналізуються, використовують ПЛР з «гарячим стартом». Для проведення «гарячого старту» застосовують спеціальне мінеральне масло, що розділяє реакційну суміш на дві фази. У ЗТ-ПЛР-наборах використовують специфічний праймер довжиною, як правило, 16 нуклеотидів і зворотну транскриптазу (MLV або M-MuLV) для проведення реакції зворотної транскрипції, а також пару праймерів і *Taq*-ДНК-полімерази для проведення ПЛР з отриманою кДНК. Слід відзначити, що етапи виділення РНК, а також проведення ЗТ-ПЛР необхідно проводити в окремих приміщеннях.

Раніше реакція зворотної транскрипції в поєднанні з ПЛР з успіхом була використана для доказу експресії РНК HIV-1 в моноклеарних клітинах периферичної крові серопозитивних носіїв і хворих на ВІЧ.

На цей час ЗТ-ПЛР використовують не тільки для індикації та ідентифікації вірусів, що містять РНК, але й для генотипування цих збудників інфекційних захворювань людей і тварин. Так, в Інституті вірусології ім. Д.І. Івановського РАМН було розроблено тест-систему на основі ЗТ-ПЛР, яка дозволяє не тільки диференціювати два підтипи вірусу грипу А – H5 та H7 – у біологічних зразках тварин і людей, але й диференціювати їх від інших підтипів вірусу А. При цьому розробку можна використовувати у двох форматах: як дві самостійні тест-системи та як тест-систему мультиплексної ПЛР, при використанні якої в одній реакції можна визначити два підтипи одночасно. Крім того, гніздова ЗТ-ПЛР лежить в основі створеного мікрочіпу (біочіпу) для визначення та диференціювання вірусу грипу А підтипів H1, H3, H5, H7 та H9.

Зворотно-транскриптазна ПЛР також використовується при проведенні кількісної ПЛР, яка дозволяє визначати вміст специфічної матричної РНК у сумарній РНК клітини. При цьому проводять двоетапну кількісну ПЛР, перший етап якої являє собою реакцію зворотної транскрипції зі статистичним набором коротких праймерів на матриці сумарної РНК. На другому етапі отриману одноланцюгову кДНК ампліфікують зі специфічними праймерами за допомогою ПЛР у режимі реального часу та визначають ефективність ампліфікації генів і, отже, кількість матричної РНК.

У лабораторії молекулярної епізоотології та діагностики Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» широко використовують комерційні набори для визначення геномної РНК збудників таких захворювань як грип, вірусна діарея, чума собак, класична чума свиней, респіраторно-репродуктивний синдром свиней та інші, а також для оцінки життєздатності бактерій за виявленням іРНК, дослідження ефективності клонування генів тварин за детекцією їх РНК-транскриптів.

Реакція ампліфікації (власне ПЛР). Варіанти ПЛР. Classic-ПЛР.

Класичний варіант ПЛР включає трьох- (чотирьох) стадійну модифікацію реакції, що супроводжується екстракцією ДНК (РНК та її зворотною транскрипцією), ампліфікацією з наступною візуалізацією ампліконів за методом електрофорезу в агарозному гелі на ТВЕ або ТАЕ-буфері.

Компоненти реакційної суміші (Мастер-міксу) змішуються у відповідних до протоколу об'ємах з розрахунку на сумарну кількість проб і контролів, після чого переносяться піпетуванням до одноразових поліетиленових пробірок типу «епендорф». До кожної з останніх на наступному етапі додається відповідний об'єм досліджуваних проб і контролів.

Як позитивний контроль найчастіше застосовують інактивовану біомасу вірусів чи бактерій або їх генетичний матеріал, який може зберігатись упродовж півроку і більше за температури мінус 20 °С. Деякі комерційні зразки тест-систем містять плазмідні ДНК (кДНК) контролі. Ця практика була впроваджена при дослідженнях щодо наявності вірусів грипу, ньюкаслської хвороби, хвороби Марека, блютангу в ННЦ «ІЕКВМ». Позитивною рисою цих контролів є їх висока специфічність, а негативною – висока концентрація ДНК, що може призвести до забруднення зразків, які аналізуються. З точки зору систем біобезпеки використання плазмідних контролів нівелює необхідність працювати з особливо небезпечними агентами під час кожного аналізу польових зразків.

Для постановки реакції ампліфікації необхідні специфічні праймери, *Taq*-полімераза ДНК, буферний розчин, оптимізований для конкретного виду полімерази (10x або 5x ПЛР-буфер), розчини або суміш розчинів дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ), розчин хлориду магнію та автоклавована деіонізована вода (яка не містить рестриктаз, ДНКаз і РНКаз).

Характеристики праймерів, дНТФ (dNTP) та ПЛР-буферу (PCR-buffer) були наведені раніше, тому в цьому підрозділі доцільно зупинитися на різновидах ДНК- полімераз.

У методах молекулярної біології найчастіше застосовують фермент *Taq*-полімерази. Цей ензим має декілька різновидів, що насамперед продиктовано його виробниками (Gold *Taq*-полімераза, Qiagene та інші). *Taq*-полімераза входить до складу всіх стандартних базових ПЛР-наборів та комерційних тест-систем для діагностики певного захворювання.

Трансформовані варіанти ензиму: AmpliTaq[®] – *Taq*-полімераза без 3 перших амінокислот у первинній структурі (синтез починається з другого Met патент US5079352). Stoffel Fragment – варіант *Taq*-полімерази, в якій відсутні перші 289 амінокислот (патент US5079352). Є група, так званих, надтермостабільних полімераз для тривалих термальних циклів (long-ПЛР, in situ-ПЛР та інших) – Pfu, Vent, Vent(exo-) та Deep Vent. Активність цих полімераз при 98 °С зберігається понад 45 хвилин, а активність елонгації – понад 5000 п.н./хв. Для звичайних ампліфікацій вони не застосовуються, можливе лише використання Pfu Platinum полімерази ДНК для постановки реакції *Continuous*-ПЛР. Полімерази додають до сумарного об'єму суміші останніми, після виймання їх з морозильної камери, пробірки розміщують на льодяну баню. Після внесення полімераз Мастер-мікс не можна перемішувати шляхом струшування на вортексі – тільки повільним піпетуванням.

Після розкапування реакційної суміші на її поверхню зазвичай нашаровують мінеральне масло, за виключенням тих моментів, коли ампліфікація проходить у термостаті, який обладнаний кришкою з підігрівом.

Під масло вносять зразки та контролі, після чого відразу пробірки переносять до ампліфікатора та запускають програму.

Ампліфікатори для класичної ПЛР бувають кількох типів:

1. За кількістю робочих блоків: моно- та багато блокові (рис. 16).
2. За характером регулювання температур: аналоговим (за температурою блоку) та активним (у пробірці).
3. З/без кришки, що нагрівається.



Рис. 16. Ампліфікатори: ліворуч – багатоблоковий (Терцик, НВФ «ДНК-технологія») та праворуч – моноблоковий (Mastercycler, Eppendorf).

Як було сказано вище, класичний варіант ПЛР передбачає змішування всіх компонентів Мастер-міксу в одній пробірці, після чого вони розкапуються в окремі пробірки в кількості, яка відповідає кількості проб, що аналізуються. Цю модифікацію іменують ПЛР з «холодним стартом». Є різновид реакції, котрий базується на так званому «гарячому старті». Мікс при цьому розподіляється на «нижній» та «верхній», між ними розкапується віск, утворюючи пробку. У «нижній» суміші знаходяться праймери та дНТФ, а у верхній – «решта» компонентів, віск при цьому не дає можливості змішування полімерази з праймерами та дНТФ. Вони контактують лише після розплавлення воску в момент початкової денатурації, що зберігає високу активність полімерази та надає більшої специфічності реакції. За таким принципом готується більшість комерційних ПЛР-наборів.

Електрофорез: облік та інтерпретація результатів ПЛР

Метод, який використовується для розділення, ідентифікації та очищення фрагментів ДНК, має назву електрофорез в агарозному гелі.

Електрофоретичний аналіз є заключним при ПЛР-тестуванні в класичному форматі, а також є способом розділення ДНК-фрагментів при рестрикційному аналізі, очищення їх для секвенування, методом аналізу плазмідних профілів мікроорганізмів тощо.

Останнім часом для проведення цього методу було впроваджено величезну кількість конструкцій приладів для електрофорезу. Але, частіше за все використовують горизонтальні електрофоретичні камери та гелі у вигляді горизонтальних пластинок. Ця система має ряд переваг – можливість використовувати низькі концентрації агарози, заливати та зберігати такі розчини

достатньо просто. При цьому також стає можливим використання недорогих апаратів, що в цілому здешевлює реакцію.

Під час проведення електрофорезу в гелі можна відстежувати положення ДНК, тому що смуги ДНК фарбуються флуоресціюючими ДНК-барвниками – бромистим етидієм низької концентрації або SYBR-Green. Молекула бромиду етидію містить плоску групу, яка інтеркалює між суміжними основами ДНК. У результаті такої структури барвник зв'язується з ДНК, що супроводжується збільшенням інтенсивності флуоресценції. УФ-випромінювання, яке поглинається ДНК в області 260 нм і передається на барвник, випромінює потім у жовтогарячої області видимого спектра (590 нм).

Бромистий етидій можна використовувати для виявлення як дво-, так і одностаничних нуклеїнових кислот (ДНК, РНК). При цьому спорідненість барвника до одностаничної нуклеїнової кислоти менш виражена, ніж до двостаничної, тому флуоресценція в першому випадку виявляється більш слабкою. У присутності барвника електрофоретична рухливість лінійної двостаничної ДНК знижується приблизно на 15 %. Але, при цьому стає можливим спостерігати за процесом розділення безпосередньо під УФ-випромінюванням. Треба додати, що бромистий етидій – це сильний мутаген, тому всі маніпуляції треба проводити виключно в рукавичках.

Переглядаючи гель в ультрафіолетовому світлі, можна зафіксувати навіть 1 нг ДНК. Швидкість пересування ДНК через гель залежить насамперед від розміру молекули ДНК, концентрації агарози, напруженості електричного поля, а також від зовнішньої температури.

Перед проведенням гель-електрофорезу готують розчини буфера та агарози. Зазвичай використовують буфери, що містять трис-ацетат (ТАЕ), трис-борат або трис-фосфат у концентрації 50 мМ (рН 7,5–7,8) (табл. 4). Можна готувати концентровані розчини та зберігати їх при кімнатній температурі.

Треба відмітити, що буферна ємність трис-ацетату є досить мала, але він використовується частіше за інші. При його використанні треба забезпечити рециркуляцію буфера між катодним і анодним резервуарами. Трис-фосфатний і трис-боратний буфери мають значну буферну ємність та забезпечують добре розділення фрагментів ДНК. При приготуванні розчину агарози необхідно брати до уваги її марку. Найкращі показники має низькоендоосмотична агароза – агароза II-го типу. Вона легко плавиться, дає прозорі розчини. Гель з такої агарози пружний навіть при невеликих концентраціях.

Таблиця 4

Буфери, які використовуються при електрофорезі

Назва буфера	Робочі розчини	Концентровані розчини (на 1 л)		
		Реактив	Кількість	рН
Трис-ацетат (ТАЕ)	0,04 М трис-ацетат (50X): 0,002 М ЕДТА	Трис	242 г	8,0
		Крижана оцтова кислота	57,1 мл	
		0,5 М ЕДТА	100 мл	
Трис-фосфат (ТРЕ)	0,08 М трис-фосфат (10X): 0,008 М ЕДТА	Трис	108 г	8,0
		85 %-ва фосфорна кислота	15,5 мл	

		0,5 М ЕДТА	40 мл	
Трис-борат (ТВЕ)	0,089 М трис-борат (5X): 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА	Трис	54	8,0
		Борна кислота	27,5 г	
		0,5 М ЕДТА	20 мл	

Загальна методика приготування гелю:

1. Необхідну кількість порошку агарози додають до відміреного об'єму електрофорезного буфера.

2. Суспензію агарози в буфері нагрівають у мікрохвильовій печі до утворення прозорого розчину.

3. Розчин охолоджують до 50 °С і додають бромистий етидій до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл.

4. У столик для заливання гелю встановлюють гребінку та повільно заливають теплий розчин агарози таким чином, щоб між дном лунки та основою гелю залишався шар агарози товщиною 0,5–1,0 мм.

5. Після повного застигання гелю акуратно виймають гребінку, а столик разом з гелем розташовують в електрофоретичній камері, після чого повільно додають достатньою кількістю електрофорезного буфера. Буфер повинен бути залитий на 1 мм вище верхнього краю гелю.

6. Якщо ПЛР-набір не містить барвників (0,025 % бромфеноловий синій або ксилолціанол), то перед внесенням проб до лунок треба змішати їх з буфером для нанесення проб, який містить 5–10 % гліцерину, 7 % сахарози або 2,5 % фікола та барвник. Як правило буфер для нанесення проб готують у вигляді розчину 6–10-кратної концентрації. Його змішують з пробою, а потім обережно вносять до лунки за допомогою автоматичної мікропіпетки.

Максимальний об'єм ДНК, який можна вносити до однієї лунки, залежить від кількості фрагментів у пробі та їх розмірів. Ширина лунки складає приблизно 0,5 см. Якщо вона буде переповнена і в смузі буде міститися більш ніж 200 нг ДНК, смуга матиме розпливчату форму. Цей дефект особливо виражений при розділенні великих за розміром фрагментів ДНК. При аналізі простого набору молекул ДНК в лунку вносять 0,2–0,5 мкг препарату. Якщо проби містять дуже велике число фрагментів ДНК різних розмірів (наприклад, рестрикти ДНК ссавців), то можна вносити по 5–10 мкг до лунки, не побоюючись зниження якості електрофорезу.

Для більш точного визначення довжини продукту ампліфікації використовують маркери. Це сукупність плазмідних або фагових ДНК, розрізаних за допомогою рестриктази. Після проведення гель-електрофорезу маркер має вигляд смуг, які відповідають 100–1000 п.н., з інтервалом довжини 100 п.н.

Електрофоретичну камеру з гелем, заповнену буфером, підключають до генератору та проводять електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації протягом 35–40 хв з напруженістю електричного поля 10–15 В/см. При цьому фронт барвника повинен «пройти» не менше 3 см.

Після закінчення електрофорезу гель обережно переносять на скло транслюмінатора та документують результат в ультрафіолетовому випромінюванні. Для цього гель фотографують за допомогою відео-систем, підключених до комп'ютера. Зазвичай транслюмінатор інтегрований до складу так званих “темних кімнат” (Dark room), оснащених камерою для фільмування гелів та комп'ютерним приладом для обробки даних, Мінімальна кількість ДНК, яке підлягає фотографуванню, складає 2 нг.

При обробці результатів у першу чергу оцінюють контрольні проби (рис. 17). В електрофоретичній стежці, яка відповідає позитивному контролю, повинна бути жовтогаряча смуга. Її електрофоретична рухомість повинна відповідати вказаній в інструкції довжині амплікону. Реєстрація такої смуги в негативному контролі свідчить про забруднення реагентів ампліконом або ДНК. Дослідні проби оцінюють за наявністю у відповідній стежці смуги, яка розташовується на тому ж рівні, що й смуга в позитивній контрольній пробі. Інтенсивність світіння смуги відповідає кількості дослідної ДНК у пробі, що дозволяє проводити напівкількісну оцінку результатів ПЛР. При цьому можна використовувати чотирьохбальну шкалу світіння. Якщо світіння смуги недостатньо виразне, то таку пробу слід дослідити додатково.

Деякі комерційні набори вміщують внутрішній контроль, який свідчить про правильну постановку реакції та дозволяє виключити отримання помилково негативних результатів унаслідок присутності інгібіторів реакції. Він має вигляд окремої смуги на електрофореграмі.

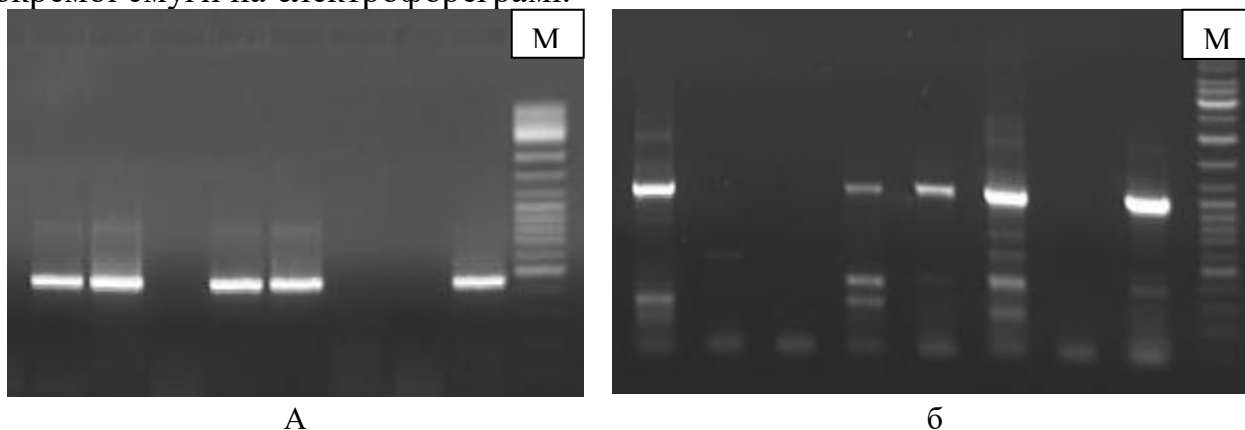


Рис. 17. Електрофореграми зі специфічними (а) та неспецифічними реакціями (б) – виявляються додаткові неспецифічні продукти ПЛР різного розміру. М – маркер молекулярної маси ДНК

Іноді для візуалізації результатів ПЛР застосовують вертикальний електрофорез у поліакриламідному гелі. Для оцінки рухливості фрагментів ДНК гелі після електрофорезу фарбують за допомогою іонів срібла з наступним проявленням і фіксацією. Перевагою цього методу є можливість зберігання оригінальних електрофореграм протягом тривалого часу у висушеному вигляді. Проте цей метод відрізняється значно вищою собівартістю, а застосовуваний при постановці поліакриламід має канцерогенні властивості, унаслідок чого метод є популярним лише в деяких лабораторіях. Застосування поліакриламідних гелів є виправленим при необхідності чіткого розділення утворених фрагментів

(особливе значення це має при ПЛР-RFLP), а також при дослідженні фрагментів малої довжини (<100 п.н.).

Real-time-ПЛР

Сучасний напрям розвитку молекулярно-генетичних досліджень базується на широкому використанні *Real-time*-ПЛР (РТ-ПЛР), варіанту реакції, що передбачає визначення не тільки якісних, а й кількісних показників вмісту нуклеїнових кислот та їх характеристик.

Метод базується на спектрофотометричній детекції ампліконів, що нівелює необхідність проведення електрофоретичного аналізу, по-перше, зводячи до мінімуму можливість контамінації, а, по-друге, можливість хибних результатів унаслідок суб'єктивної оцінки електрофореграм.

Високої специфічності реакції досягається завдяки присутності не двох, а фактично праймерів (включаючи зонд), а також більш ефективного набору контролів. Класичним підходом сьогодні є використання так званих внутрішніх контролів ампліфікації, заснованих на використанні у якості таргетних генів, присутніх у геномах більшості багатоклітинних організмів, але водночас відсутніх у мікроорганізмів, чиї гени планується виявляти. Ампліфікація таких контрольних зразків проходить з утворенням флуоресцентного сигналу з детекцією на іншому каналі читання та свідчить про коректність пробопідготовки та ходу реакції.

Великим кроком вперед є те, що при створенні *Real-time*-ПЛР-технологій з'явилася можливість контролювати процес збільшення концентрації ампліконів у реальному часі, на кожній стадії кожного термального циклу.

Постановка ПЛР при цьому стає менш затратною з точки зору реактивів, оскільки об'єм реакційної суміші суттєво знижується.

Усі вимірювання на РТ-ампліфікаторах (рис. 18) проводить скануючий промінь, чия дія базується на захопленні фотонів, котрі випромінює речовина-маркер, яка генерує флуоресцентний імпульс під час відпалу зондів, або елонгації. Сьогодні існує кілька класів таких маркерів, що дозволяє одночасно реєструвати до семи показників у процесі ампліфікації.

Результат реакції можна реєструвати на екрані монітора комп'ютера безпосередньо у процесі ПЛР-ампліфікації. Для кількісних варіантів досліджень у режимі ПЛР необхідно мати відповідні стандарти, які використовують для побудови калібрувальних кривих після проведення полімеразної ланцюгової реакції.



Рис. 18. Ампліфікатори для ПЛР у режимі реального часу.

Використовуючи згадані криві, можна вирахувати невідому вихідну кількість копій ДНК (РНК) у зразках.

Із основних переваг ПЛР у реальному часі слід виділити наступні:

- реєстрація інтенсивності флюоресценції вказує на кількість інфекційного агента в пробі;
- виключається головна причина хибно позитивних результатів – розсіювання продуктів ампліфікації з аерозолями і персоналом у процесі гель-електрофоретичної детекції;
- потрібно лише декілька годин для отримання результату (швидкість аналізу);
- наявність додаткового специфічного зонду (який є комплементарним внутрішній ділянці фрагмента, що ампліфікується) знижує ризик отримання хибно позитивних результатів і збільшує чутливість аналізу;
- з'являється можливість проводити множинну ПЛР, тобто реєструвати в одній пробірці наявність декількох інфекційних агентів, використовуючи різні флюорисцентні барвники;
- з'являється можливість ідентифікувати в продукті ампліфікації поодинокі нуклеотидні заміни.

Крім того, розроблено кілька модифікацій РТ-ПЛР, у тому числі - *Real-time-nested-ПЛР* та *Real-time-multiplex-ПЛР*.

ПЛР у реальному часі застосовується з метою дослідження вмісту тих чи інших патогенів у зразках біоматеріалів, експресуючої активності окремих генів, при виявленні мутаційних змін, для якісної та кількісної оцінки щодо вмісту ГМО у продуктах ветеринарного та санітарно-епідеміологічного нагляду.

Причини неспецифічних і хибних результатів за ПЛР-аналізу

Завдяки високій чутливості та специфічності методу ПЛР існує проблема отримання хибно позитивних або неспецифічних результатів аналізу внаслідок можливості попадання до реакційної пробірки слідових кількостей специфічних продуктів ампліфікації ДНК – ампліконів, одержуваних у великій кількості протягом щоденної роботи; ДНК-стандарту, який використовується в якості позитивного контролю; позитивної ДНК клінічного зразка.

При ПЛР-діагностиці співробітники наукових і практичних лабораторій як правило мають справу з трьома видами контамінації:

1. Перехресна контамінація від пробі до пробі (у процесі обробки клінічних зразків або при розкапуванні реакційної суміші), що приводить до появи спорадичних хибно позитивних результатів.

2. Контамінація рекомбінантними плазмідами, які містять клоновані послідовності гена, який детектується, що часто використовуються в якості позитивного контролю.

3. Контамінація продуктами ампліфікації (ампліконами), що є найбільш частою причиною хибно позитивних результатів, оскільки в процесі ПЛР-генодіагностики амплікони накопичуються у великих кількостях, дуже легко переносяться з аерозолями, передаються через поверхню приладів та є ідеальними продуктами для реампліфікації. Контамінація слідовими кількостями ампліконів посуду, автоматичних піпеток і лабораторного обладнання, поверхнею лабораторних столів або навіть шкіри співробітників

лабораторії призводить до появи систематичних хибно позитивних результатів. Як правило, визначити джерело контамінації буває дуже важко й вимагає значних витрат часу та коштів.

Внаслідок цього при проведенні робіт з використанням методу ПЛР для запобігання контамінації необхідно дотримуватися наступних правил:

1. Територіально розділяти різні стадії аналізу, розміщуючи їх у різних приміщеннях (див. облаштування ПЛР-лабораторії). Крім того, підготовку реагентів для виділення нуклеїнових кислот, проведення ПЛР та детекції результатів реакції бажано проводити в окремому приміщенні (наприклад, у пре-ПЛР-кімнаті або відповідній біохімічній лабораторії).

2. Для проведення кожної стадії аналізу повинен бути свій комплект лабораторного одягу, автоматичних піпеток (дозаторів), допоміжних матеріалів та обладнання. При цьому на всіх етапах роботи слід використовувати тільки одноразові витратні матеріали – пластикові пробірки, наконечники для дозаторів тощо.

3. Необхідною є періодична постановка негативних контрольних зразків як при екстракції нуклеїнових кислот, так і при ампліфікації для перевірки чистоти реактивів.

4. Роботу повинен проводити спеціально підготовлений персонал, що має достатню кваліфікацію в даній галузі.

5. Необхідно проводити контроль чутливості ПЛР-аналізу шляхом постійної постановки позитивних контрольних зразків.

6. У всіх приміщеннях ПЛР-лабораторії повинні бути встановлені бактерицидні лампи з розрахунку $2,5 \text{ Вт/м}^3$. Робочі поверхні та обладнання всіх приміщень ПЛР-лабораторії необхідно опромінювати ультрафіолетовим світлом з максимумом випромінювання в області 260 нм протягом 1 години до початку та після завершення роботи, обробляти дезінфікуючим розчином (указаним для конкретного виду збудника), а потім етиловим спиртом.

7. Один раз на місяць у всіх приміщеннях ПЛР-лабораторії слід проводити вологе прибирання з використанням 5 %-ого розчину хлораміну Б.

8. Двічі на рік необхідно здійснювати обробку автоматичних дозаторів. Дозатори розбирають, обробляють миючим розчином для видалення жирового забруднення, після чого залишки миючого засобу видаляють марлею, змоченою водою. Потім проводять обробку 1 М розчином соляної кислоти протягом 1 години, залишки якої ретельно видаляють та знезаражують вологі поверхні ультрафіолетовим випромінюванням протягом 1 години. По закінченні обробки дозатори збирають та калібрують згідно з доданою до них інструкцією з використання. Дозатори, які можна автоклавувати, знезаражують паром під тиском $2,0 \text{ кгс/см}^2$ ($0,2 \text{ МПа}$) за температури $132 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 60 хвилин.

Дотримання даних правил зводить до мінімуму можливість контамінації та отримання хибно позитивних або неспецифічних результатів ПЛР-аналізу. У випадку, коли контамінація все-таки виникла (про що свідчить отримання повторних позитивних результатів у негативних контролях, а також при тестуванні контрольних змивів з робочих поверхонь) у приміщеннях ПЛР-

лабораторії проводять заходи щодо ліквідації контамінації, обсяг яких залежить від її масштабу.

До числа цих заходів належать насамперед утилізація всіх реактивів контамінованого приміщення; утилізація досліджуваних матеріалів на всіх проміжних стадіях обробки (крім початкової); генеральне прибирання, хімічна та ультрафіолетова дезінфекція всіх поверхонь лабораторних приміщень; дезінфекція меблів, робочих поверхонь, а також поверхонь корпусів приладів та обладнання за допомогою хімічних методів та ультрафіолетового випромінювання; обробка паром під тиском усього спецодягу контамінованого приміщення ПЛР-лабораторії. Випадки контамінації слід реєструвати в спеціальному журналі з вказівкою заходів щодо її усунення. Проведення ПЛР-досліджень до завершення деконтамінаційних заходів не допускається.

7. Секвенування та біоінформатичний аналіз послідовностей нуклеїнових кислот

З-поміж існуючих напрямів молекулярно-генетичного аналізу в системі діагностики інфекційних захворювань тварин велика роль належить так званим аналітичним методам дослідження послідовності нуклеїнових кислот збудників та макроорганізмів та вивченню їх функціональної структури.

Основним методом такого дослідження є секвенування – визначення послідовності нуклеотидів у нуклеїнових кислотах.

Перші дані секвенування були отримані ще на початку 70-х рр. минулого століття. Якщо звернутися до історії, ще раніше, у 60-ті рр., були створені методи визначення амінокислотних послідовностей, а з розшифруванням генетичного коду стало можливим проводити зворотну трансляцію, що надало змоги оцінювати послідовності ДНК.

Секвенування набуло значних обсягів після створення методів, заснованих на застосуванні барвників і процес став автоматизованим. Завдячуючи цим новим знанням, обсяги використання аналізу стали збільшуватись щороку в десятки разів, надаючи можливості поглибленого вивчення генів і геномів не лише мікроорганізмів, але й людини, свійських і диких тварин.

Поглиблене дослідження структури нуклеїнових кислот дало початок ряду нових наукових напрямів, таких як геноміка, протеоміка, молекулярна епідеміологія (епізоотологія) тощо.

Молекулярна епідеміологія (епізоотологія) – це наука, що вивчає якої є молекулярні механізми, що становлять основу розвитку епідемічного (епізоотичного) процесу. Сюди, зокрема, входять виникнення та становлення епідемічних (епізоотичних) різновидів збудників, поширення інфекції та згасання епідемічної (епізоотичної) хвилі, збереження чинників у міжепізоотичний період. Методологія спостереження за цими процесами і явищами складається головним чином з методів молекулярної діагностики.

Молекулярно-епідеміологічні підходи та принципи набувають все більшого визнання та широкої популярності у світовій медичній та ветеринарній науці, вже є певний досвід їхнього практичного застосування. Досить сказати, що успішна реалізація відомих великомасштабних проєктів останніх років в області епідеміології та епізоотології, що здійснюється в країнах Європейського союзу, у Північній Америці, ґрунтувалася на засобах, методах, організаційно-цільовій тактиці, насамперед, молекулярно-генетичного порядку. Мова йде про такі проєкти, як стратегія «ерадикація проти вакцинації» у системі контролю ящуру тварин в Європі, де ключовим моментом є молекулярно-епізоотологічний моніторинг щодо глобального поширення збудника, який супроводжується вивченням еволюції останнього: DIVA-стратегія (DIVA – Differentiation of Infecting and Vaccinating Animals) контролю гострих висококонтagioзних інфекцій за допомогою застосування маркованих делеційних вакцин, наприклад, контроль сказу, у якому при використанні оральної вакцинації диких м'ясоїдних провідну роль відіграє діагностична диференціація епізоотичного та вакцинного вірусу за допомогою

панелі моноклональних антитіл, епідеміологічний нагляд за пріонними інфекціями.

Методи молекулярної епідеміології дозволили встановити походження ряду збудників інфекційних хвороб людини (SARS, SARS-CoVi2 (COVID-19), ВІЛ-СНІДу).

Сьогодні чималих здобутків досягнуто в аналізі лікарської стійкості мікроорганізмів за аналізом генетичних маркерів резистентності до антибіотичних речовин (туберкульоз людини, MRSA-асоційовані інфекції).

Окрім захворювань інфекційної природи, сфера впливу молекулярної епізоотології охоплює великий масив паразитарних, у тому числі, і зооантропонозних захворювань.

Розвиток молекулярної епізоотології проходив паралельно з аналогічною наукою медичного напрямку – молекулярною епідеміологією. Перші відомості про молекулярну епізоотологію можна віднести до середини 80-х років, коли рестрикційно-ензимний аналіз, ПЛР та секвенування стали входити до арсеналу методів дослідження біологічних властивостей збудників інфекційних захворювань тварин.

Молекулярна епідеміологія хвороб людини та епізоотологія хвороб тварин є основними галузями, де відбувається впровадження методів секвенування та біоінформатичного філогенетичного аналізу в системі лабораторних досліджень.

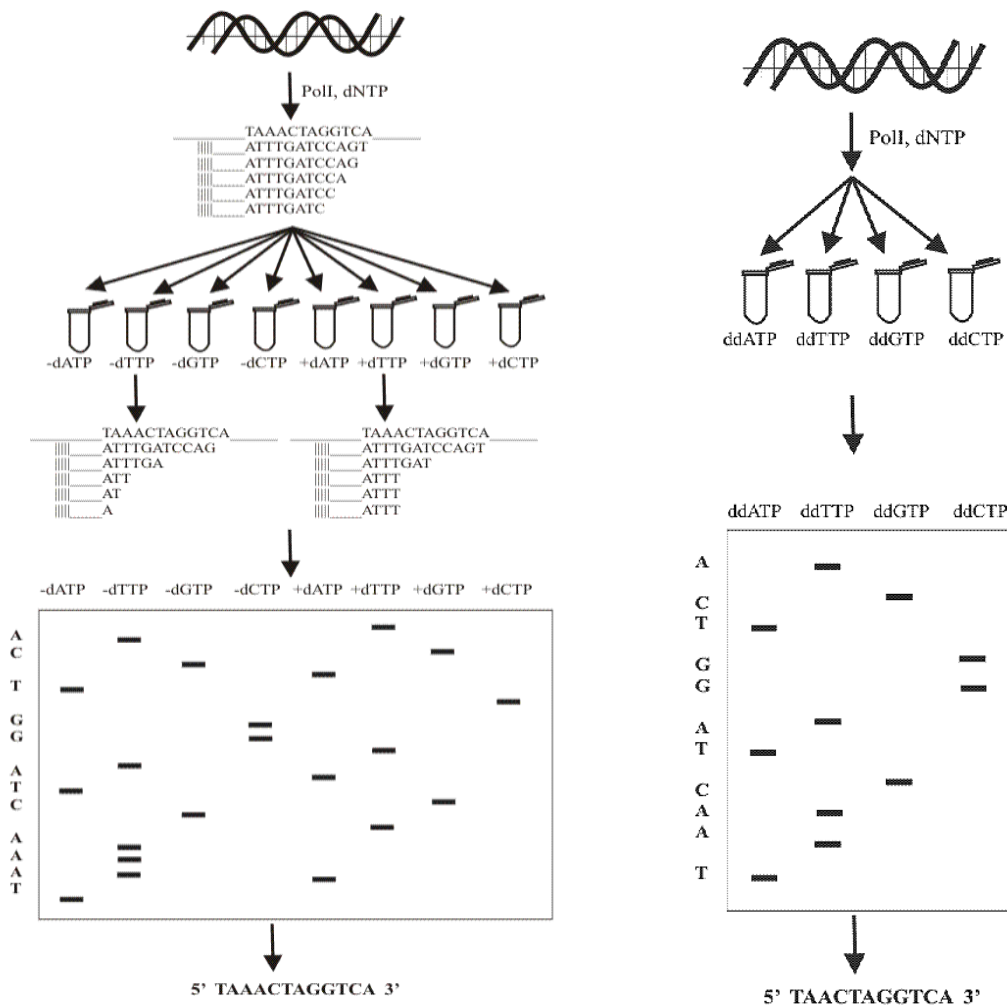
Прикладні аспекти застосування секвенування у медицині можна поділити на декілька напрямів, а саме:

- дослідження відповідності паспортних характеристик мікроорганізму (рід, вид, серотип, патотип, генотип, маркери патогенності чи корисних ознак);
- вивчення варіабельності мікроорганізмів і молекулярно-епізоотологічних характеристик;
- дослідження біотехнологічних ознак мікроорганізмів;
- ідентифікація нових видів і популяцій мікроорганізмів;
- вивчення маркерів резистентності та продуктивності тварин;
- філогенетичні дослідження мікро- та макроорганізмів;
- дослідження мутагенезу.

За всю історію від винайдення методу до сьогодні було описано кілька модифікацій метода секвенування.

Найбільш старим видом методу секвенування був протокол, запропонований Ф. Сангером та Д. Коулсоном у 1975 р. За допомогою вказаного способу була секвенована геномна ДНК фагу фХ174 розміром 5386 п.н.

Матрицею в реакції виступала одноланцюгова ДНК-молекула, праймерами були синтетичні або рестриктні (отримані шляхом ендонуклеазного гідролізу) олігонуклеотидні фрагменти, комплементарні до неї, а як полімераза використана PolI (фрагмент Кленова) *E. coli*. Цей метод отримав назву «плюс-мінус» метод Сангера (рис. 19).



A)

Б)

Рис. 19. Секвенування методами Сангера (А – «плюс-мінус»-метод, Б – метод «термінаторів») (А. Будилов, SMHGlub, www.molbiol.edu.ru).

Реакція секвенування налічувала два етапи. На першій стадії проводили полімеразну реакцію з dNTP, один з типів при цьому був міченим за фосфатною групою. У ході реакції отримували набір фрагментів, які піддавались очищенню від нуклеозидтрифосфатів і досліджували у вигляді восьми партій: 4 – у +-системі (присутність нуклеозидтрифосфата певного виду) та 4 – у --системі (його відсутність). У результаті в --системі термінація проходила перед dNTP певного типу, а в +-системі – після нього. Отримані вісім варіантів продукту аналізували електрофоретично та за характером термінації визначали первинну нуклеотидну послідовність ДНК.

Іншим методом, який у певній модифікації сьогодні є лідуючим за широтою використання, також створений Сангером Ф., це *метод «термінаторів»*. Оригінальна його модифікація передбачала наявність специфічних праймерів синтетичного походження та полімерази PolI (фрагмент Кленова). Різниця методу від попереднього полягала в тому, що в реакції використовували чотири типи мічених радіоактивною міткою нуклеозидтрифосфати та, одночасно, дідезоксинуклеозидтрифосфати, які при вбудовуванні до полімеризованого зразка припиняли подальший процес елонгації. При цьому для кожного зразка використовували по чотири пробірки.

До реакційної суміші в кожній з них додавали один мічений та три не мічених нуклеозидтрифосфати, та гомологічний міченому термінуючий дідезоксинуклеозидтрифосфат. Продукти реакції досліджували електрофоретично в поліакриламідному гелі з наступною візуалізацією на рентгенівських плівках шляхом їх опромінення та проявлення.

Широку популярність свого часу мав *метод «хімічної деградації»*, запропонований А. Максамом та У. Гілбертом у 1976 р. Вказаний метод ґрунтувався на специфічній деградації ДНК-ланцюга, що несе радіоактивну мітку з одного кінця. Препарат ДНК розділяли на чотири частини, які обробляли хімічною субстанцією, котра зумовлювала модифікацію однієї-двох з чотирьох основ. Оригінальна методика передбачала метилування аденінових і гуанінових основ диметилсульфоксидом, а тимінових і цитозинових – гідразином. Модифіковані ланцюги розщеплювали піперидином, внаслідок чого утворювався повний набір субфрагментів різної довжини.

Продукти реакції досліджували електрофоретично в поліакриламідному гелі з наступною візуалізацією на рентгенівських плівках шляхом їх радіоактивного опромінення та проявлення. Внаслідок подальшого читання рентген-відбитків дослідники отримували повну послідовність аналізованого фрагменту.

На сьогоднішній день останні два способи трансформувались до методу застосування *«кольорових термінаторів»*, який лежить в основі *«автоматичного секвенування»*. Суть останнього полягає в тому, що фрагмент, який секвенують, вступає до реакції з міченими різними барвниками дідезоксинуклеозидтрифосфатними термінаторами (рис. 20).

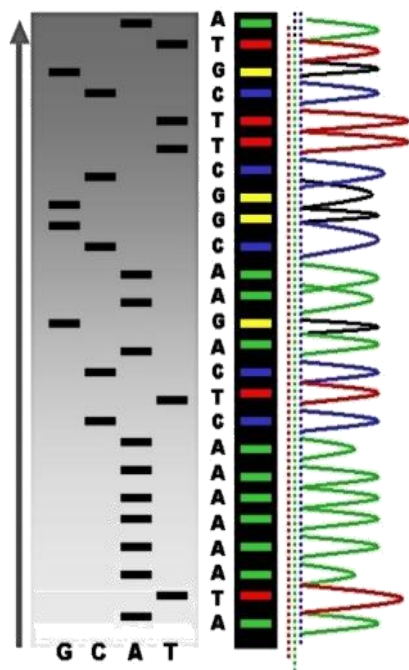


Рис. 20. Секвенування методом «термінаторів» (ліворуч) та автоматичного секвенування (праворуч) (www.en.wikipedia.org).

Внаслідок реакції хімічного секвенування в присутності праймерів (пробу секвенують з прямого та зворотного праймерів в окремих пробірках), полімерази, нуклеотидів і термінаторів проводять реакцію, що має цикли, подібні до ПЛР, утворюються продукти різної довжини від 1–2 до n п.н. При цьому ланцюг закінчується термінатором. У подальшому, при електрофоретичному обліку реакції за допомогою автоматичного ДНК-аналізатору (секвенатору), ці продукти піддаються капілярному електрофорезу та детектуються фотометрично від коротшого до найдовшого, що дозволяє за сигналом термінатора визначити нуклеотидну послідовність ДНК.

Технологія автоматичного секвенування активно впроваджується в медичних і загальнобіологічних цілях. За потужністю цей метод дозволяє проводити секвенування зразків матриці довжиною 300–400 п.н. (оптимальна довжина) і до 1100 п.н. (максимальна довжина). Ефективність визначення послідовностей при цьому складає 90–95 % та 65–85 %, відповідно.

Існує два варіанти секвенування методом мічених термінаторів: пряме секвенування (секвенування амплікону) та непряме, або плазмідне, секвенування (коли досліджувана матриця спершу клонується до складу плазмідного вектору).

Пряме секвенування являє собою секвенування ПЛР-продукту отриманого з матриці ДНК або кДНК методом ампліфікації. Для його здійснення сумарну ДНК (кДНК) досліджують методом полімеразної ланцюгової реакції з праймерами, що обмежують варіабельну ділянку того чи іншого гена. Отриманий при цьому специфічний фрагмент генетичного матеріалу збудника аналізують шляхом гель-електрофорезу, визначають його відповідність за розміром. При відсутності додаткових продуктів у суміші її очищують методом колонкової сорбції від залишків праймерів та інших компонентів мастер-міксу, після чого досліджують у реакції секвенування. У разі наявності додаткових продуктів останніх позбавляються шляхом препаративного вилучення ділянки гелю, що містить цільовий амплікон, з нього екстрагують ДНК та досліджують у реакції секвенування.

При необхідності дослідження повної послідовності того чи іншого гена або генома застосовують системи праймерів, що перекривають утворюваними продуктами весь ДНК-фрагмент, що є об'єктом дослідження. При цьому важливо розподілити його на ділянки 200–500 п.н., що мають накладатися одна на одну в кінцевих областях з метою подальшого забезпечення ідентифікації вірогідної послідовності.

При непрямому секвенуванні амплікон або рестрикт геномного матеріалу очищують і поміщають до прадідної ДНК.

Плазмідні ДНК, що застосовують для секвенування можуть бути представлені векторами типу M13, або їх модифікаціями (ТОРО, pCR-Blunt (I-IV) та іншими) (рис. 18).

Аналізований фрагмент вбудовують до сайтів рестрикції M13-ДНК або TA-сайтів, або Blunt-сайтів. З метою вставки продукту до M13-ДНК використовують ПЛР-продукти з праймерами, що містять сайти рестрикції, котрі забезпечують комплементарне зшивання ПЛР-продукту (рестрикту) і векторної ДНК. При вбудовуванні у відкриті вектори (ТОРО, pCR-Blunt (I-IV)) застосовують ПЛР-продукти з реакції в присутності Taq- або Pfu-полімерази, відповідно.

Аналізовані фрагменти піддають лігіюванню з молекулою-носієм шляхом впливу лігази T4 чи інших, після чого кільцевим вектором трансформують компетентні клітини *E. coli*. З трансформованих клітин отримують антибіотикорезистентні клони, виділяють з них ДНК та очищують.

Секвенування фрагментів здійснюють за допомогою праймерів, що комплементарні не вбудованому фрагменту, а прилеглим до нього ділянкам плазмідної ДНК.

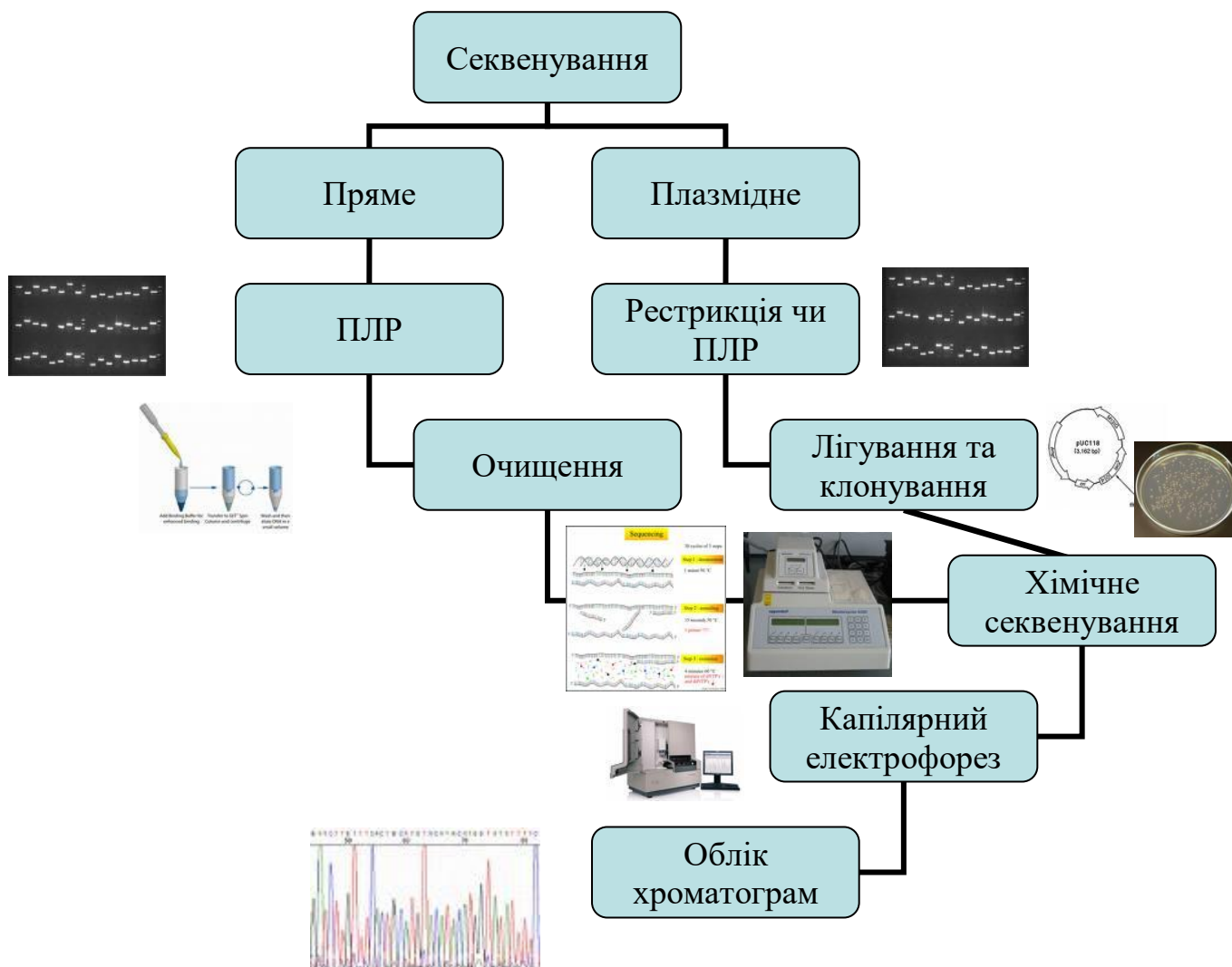


Рис. 21. Схема процесу секвенування ДНК методом Сангера.

Далі аналізований фрагмент ДНК обробляють в реакції секвенування (секвенс-ампліфікація, хімічна частина аналізу) здійснюється з використанням базових наборів для секвенування, що вміщують компоненти реакційної суміші, такі як полімераза, буфер для полімерази, dNTP та мічені фарбниками ddNTP-термінаторами. До підготованої суміші додається 4 рМ праймеру, при цьому формують панель пробірок для секвенування з прямого праймера та відповідну панель для зворотного праймера. У разі секвенування фрагментів довжиною до 300–350 п.н. реакцію можна проводити з використанням лише одного з праймерів. Отриману в ході циклів сукупність продуктів різної довжини очищують через колонки для продуктів секвенування та вводять до ДНК-аналізатора (секвенатора) з метою електрофоретичного аналізу (табл. 5).

Таблиця 5

Термічні цикли при секвенуванні

№ з/п	Етап	Температура	Час	Кількість повторень
1	Денатурація	94 °С	30 сек.	25
2	Відпал праймерів	T _m	40 сек.	
3	Елонгація	68 °С	10 хв	

Аналіз продуктів проводиться в капілярній електрофоретичній системі. Кінець капіляру сумісний з детектором флуоресценції, який сприймає сигнал, перетворюючи його на кольоровий пік, що відповідає тому чи іншому нуклеотиду. Сукупність детектованих піків дає карту послідовності та називається хроматограмою секвенування (рис. 22).

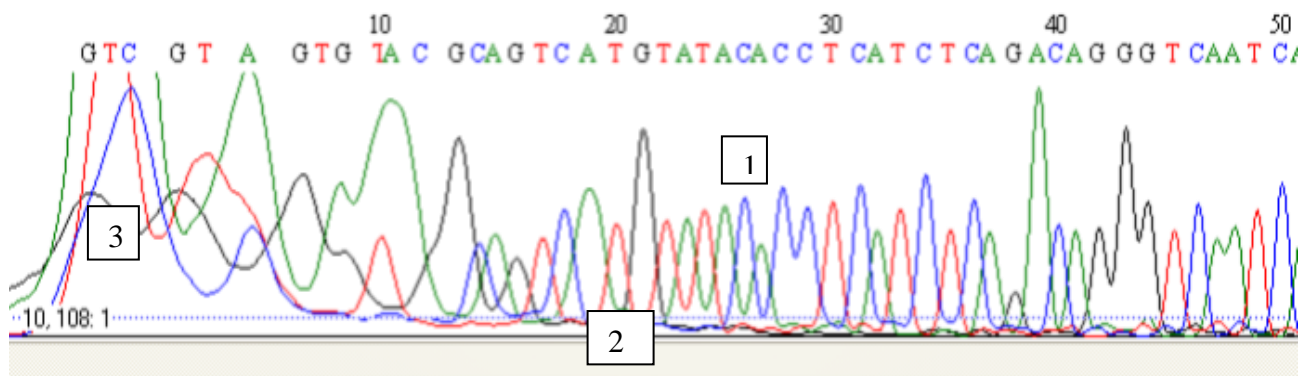


Рис. 22. Хроматограма секвенування (на прикладі гена F вірусу ньюкаслської хвороби): 1 – читабельна область (піки виражені та не мають ділянок схрещування з сусідніми), 2 – рівень базових шумів хроматограми, 3 – термінальна нечитабельна область (надвисокі та переміжні піки).

З метою досліджень отриманих хроматограм проводять коригування послідовностей. Суть коригування полягає у вилученні не розпізнаних ділянок і позицій, що викликають сумніви. Що стосується термінальних областей, їх вилучають, компенсуючи недостатні відомості про пряму чи комплементарну послідовність за їх порівнянням. Те саме роблять і з розпізнаними позиціями. Якщо сумнівні результати за локусом повторюються, послідовність додатково порівнюють з типовими послідовностями даного таксону, які отримують з GenBank.

Найбільш сучасним підходом ДНК аналізу є так зване секвенування нового покоління (Next Generation Sequencing, NGS).

Першим винайденим способом NGS-секвенування була методологія 454, створена компанією Roche. Вказана технологія секвенування має ряд суттєвих переваг над існуючими на сьогодні технологіями в області секвенування. До числа позитивних сторін відноситься надзвичайна продуктивність та експресність (до 20 млн. п.н. за 5,5 годин), відсутність необхідності в клонуванні продуктів для секвенування, можливість створення геномних бібліотек без клонування та інші.

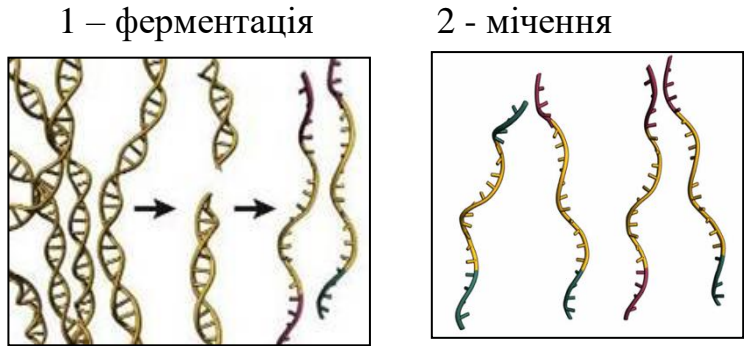
З метою проведення досліджень за цією технологією підготовляють екстракти геномної ДНК, кДНК або бібліотеки на основі бактерійних артефактних хромосом (BAC). Вказані продукти піддають ферментації з метою отримання одноланцюгових ДНК-фрагментів. З останніх готують бібліотеку шляхом мічення термінальних ділянок для емПЛР-титрування. Мічені фрагменти піддають емульсифікації та клональній ампліфікації на сфероподібних синтетичних носіях, які містять локуси, сприйнятливі до кінцевих міток фрагментів та інтегровані до міні-ПЛР-реакторів. Позитивні

щодо специфічної ампліфікації сфери вивільняються з реакторів і застосовуються для секвенування.

Секвенування здійснюється під час полімеризації клонованих ДНК-ланцюгів на носіях у присутності ферментних гранул, що генерують флуоресцентні сигнали, які сприймаються детекторною системою та перетворюються до хроматограм секвенування.

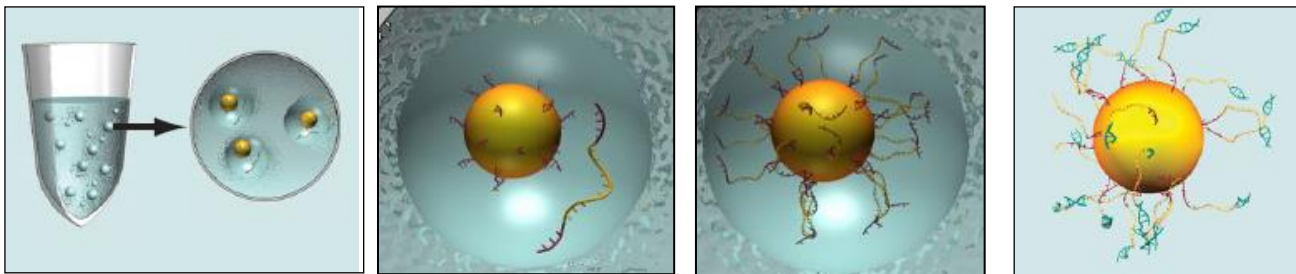
Схематично весь процес представлений на рис. 23.

Підготовка одноланцюгових мічених ДНК



Інтеграція ДНК до мікрореакторів

загальний вид - 1 та 2 – інкапсуляція 3 – примноження 4 – декапсуляція та клонування



Секвенування під час елонгації ДНК-фрагментів

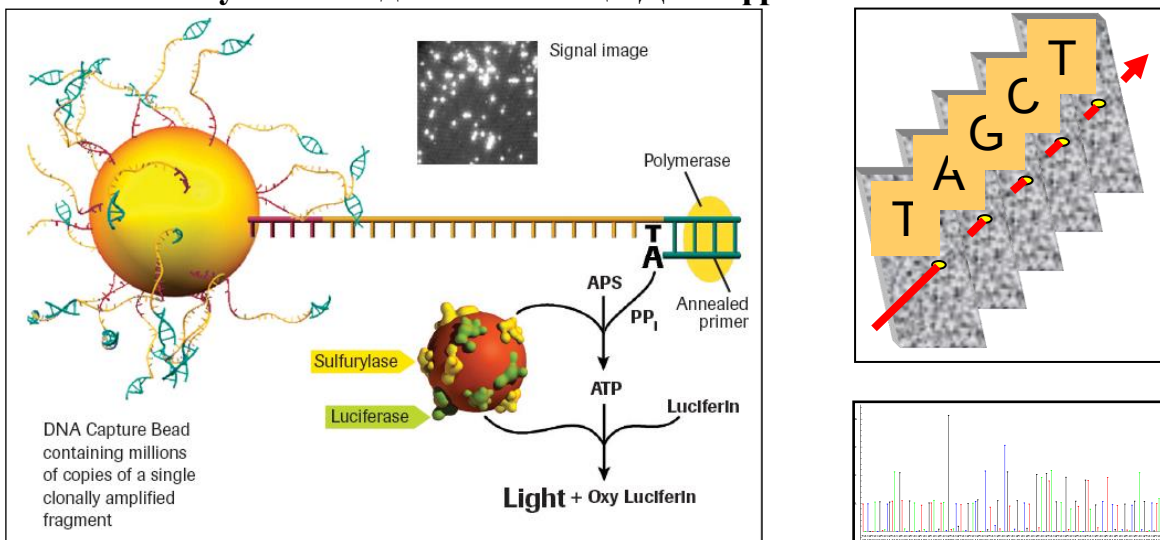


Рис. 23. Схема підготовчих процедур і секвенування за 454-методологією.

Застосування 454-технології дозволяє уникнути трудомістких і тривалих у часовому відношенні процесів клонування фрагментів до бактерійних клітин,

селекції та інших процедур, замінивши їх інтеграцією та експрес-клонуванням аналізованих фрагментів у високоспецифічній синтетичній системі.

Аналіз даних секвенування також стає набагато продуктивнішим за рахунок уникнення систем очищення, хімічного секвенування в присутності термінаторів та електрофорезу. Нова технологія поєднує ідентифікацію нуклеотидних послідовностей та хімічну частину секвенування в єдиний процес.

Ряд переваг містить і система реєстрації та обліку даних секвенування, що дозволяє швидко та надійно ідентифікувати нуклеотидні послідовності аналізованих генів і геномів.

Крім методології Rosche запропоновано ще кілька ефективних платформ NGS, які доцільно розглянути.

Першим і найбільш продуктивним альтернативним методом NGS став метод Illumina/Solexa — метод секвенування нового покоління, створений компанією Solexa. У його основу покладений принцип секвенування шляхом синтезу, який передбачає такі етапи:

Спершу одноланцюгові ДНК-фрагменти напрацьованої геномної бібліотеки імобілізуються на твердій підложці.

Далі відбувається синтез компліментарних ДНК-ланцюгів за допомогою ДНК-залежної ДНК-полімерази.

Вбудовування кожного нового нуклеотиду в ланцюг реєструється інструментально.

При секвенування методом Solexa використовують 3'-модифіковані нуклеотиди з флуоресцентними мітками різного кольору. Модифікація нуклеотидів не дозволяє ДНК-полімеразі приєднати більше одного нуклеотиду. Флуоресценція індукується імпульсним лазерним опроміненням та, в залежності від виду нуклеотиду, має різний колір сигналу. Далі модифікація нуклеотиду блокується і полімераза рухається далі, повторюючи флуоресцентний цикл. У результаті можна «прочитати» послідовність ДНК довжиною до 250 нуклеотидів.

Перший секвенатор Genome Analyzer 1G був представлений Solexa ще у 2006 р. Довжина читання складала 30-35 нуклеотиди, у результаті чого можна було отримати близько 1 Gb інформації. Наступний прилад HiSeq 2000 (2011 р.) та більш сучасні модифікації здатні відсеквенувати 6 людських геномів за 11 діб. Довжина читання складає 100 нуклеотидів, а у результаті циклу читання можна акумулювати до 600 Gb інформації про нуклеотидні послідовності.

Аналізу за цим методом передуює підготовка ДНК. Досліджувана ДНК на початку фрагментується. До дволанцюгових фрагментів лігуються невеликий за розміром ДНК-фрагмент — адаптер. Адаптер складається з двох олігонуклеотидів, що є частково комплементарними один до одного частинно. При змішуванні таких олігонуклеотидів формується т.з. гама-подібна «виделка», «ніжка» якої складається з дволанцюгової ДНК (комплементарні області олігонуклеотидів), два інших кінця складаються з одноланцюгової ДНК. ДНК-лігаза з'єднує два адаптери за «ніжку» з кожним кінцем досліджуваного ДНК-фрагменту.

Далі відбувається ампліфікація отриманих фрагментів ДНК за допомогою ПЛР. У результаті реакції синтезується безліч фрагментів дволанцюгової ДНК, на одному кінці - перший олігонуклеотид з складу адаптеру, на іншому кінці - другий.

Підготовка ячейки (flowcell)

Кожна ячейка містить усередині 8 доріжок. У кожній доріжці може секвенуватися окремий зразок ДНК.

На поверхню кожної доріжки пришиваються одноланцюгові олігонуклеотиди. Такі ж, що використовувалися під час синтезу адаптеру. Ці олігонуклеотиди в майбутньому з'являють досліджувану ДНК (оскільки вони комплементарні адаптеру) і служать праймерами для «місткової» ампліфікації. У одному з олігонуклеотидів міститься сайт пізнавання для рестриктаз.

Місткова ампліфікація

Проводиться плавлення досліджуваної ДНК і вже одноланцюгові її фрагменти гібридизуються з закріпленими на підложці праймерами.

У систему додається все необхідне для ПЛР, крім праймерів. Праймери вже іммобілізовані на підложку.

Полімераза добудовує комплементарний ланцюг. Тепер кожен досліджуваний фрагмент виглядає як дволанцюгова ДНК, кінець одного з ланцюгів пришитий до поверхні ячейки.

Проводиться плавлення дволанцюгової ДНК, в результаті якого комплементарні ланцюги ДНК розходяться. Ланцюг ДНК, який не був закріплений на поверхні, видаляється. Кожен досліджуваний фрагмент є одноланцюговою ДНК, пришитою до поверхні ячейки.

Своїм незакріпленим кінцем ланцюг ДНК може гібридизуватись за принципом комплементарності з другим іммобілізованим олігонуклеотидом. Тепер фрагмент розташований у вигляді «містка» - один кінець пришитий до поверхні, інший тримається за рахунок комплементарних взаємодій.

Полімераза знову добудовує комплементарний ланцюг, використовуючи як праймер другий олігонуклеотид.

Після плавлення та видалення незакріплених ланцюгів ДНК фрагмент виглядає як дві одноланцюгові ДНК, прикріплені до поверхні. Один ланцюг розташований «вгору ногами» щодо прикріпленої ДНК. Вільний кінець кожного з ланцюгів може утворити місток з іммобілізованим олігонуклеотидом.

Після ампліфікації навколо кожного закріпленого фрагмента з'являється велика кількість його копій. Половина з копій розташована «нагору ногами». Додається рестриктаза, яка розщеплює один із прикріплених олігонуклеотидів - непотрібні копії вимиваються. Тепер усі копії ДНК, отримані внаслідок ампліфікації з початкового фрагмента, розташовані однаково.

Секвенування

ДНК-залежна ДНК-полімераза синтезує комплементарний ланцюг ДНК. Вбудовування кожного нового нуклеотиду реєструється за допомогою камери. До системи додаються праймери та ДНК-полімераза. Також додаються 3'-О-азидометил 2'-деоксинуклеозид трифосфати (А, С, G і Т), кожен з

флюоресцентною міткою свого кольору. Наявність 3'-О-азидометилу не дозволяє ДНК-полімеразі приєднати більше одного нуклеотиду.

Полімераза приєднує один модифікований нуклеотид, нуклеотиди, що залишилися, вимиваються.

Ячейку опромінюють коротким лазерним імпульсом. Приєднаний флюорофор світиться своїм кольором, що відповідає нуклеотидам кожного окремо узятото виду. Оскільки після ампліфікації навколо кожної молекули ДНК є безліч її копій, світло множини однакових флюорофорів можна зареєструвати.

До системи додається речовина ТСЕР, через яку флюорофор та азидометил відокремлюються та вимиваються. 3'-гідроксильна група стає доступною для приєднання ще одного нуклеотиду.

Варіанти секвенування

Можливі кілька варіантів секвенування:

Секвенування одиночних прочитань (Single-read sequencing). Даний метод дозволяє секвенувати до 8 різних зразків в одній ячейці. За один цикл виходить до 100 мільйонів прочитань завдовжки до 75 нуклеотидів.

Секвенування парних прочитань (Paired-end Sequencing). Дозволяє секвенувати два кінці довгого фрагмента ДНК. При використанні коротких фрагментів секвенується і прямий, і зворотний ланцюг, що підвищує точність секвенування. За один прогін виходить до 200 мільйонів прочитань завдовжки 75 пар основ. ДНК фрагментують на ділянки завдовжки 200-500 нуклеотидів. До кінців ДНК пришивають два види адаптерів, так щоб до різних кінців одного фрагменту ДНК були приєднані різні адаптери. Після місткової ампліфікації протилежно орієнтовані копії вихідного фрагмента не видаляються. У систему додається праймер одного виду адаптера і секвенується прямий ланцюг ДНК. Потім додається праймер другого адаптеру і секвенують комплементарний ланцюг.

Множинне (мультиплексне) секвенування (англ. Multiplex Sequencing). Дозволяє одночасно секвенувати до 12 різних зразків на одній доріжці і до 96 зразків в одній ячейці (flowcell). При підготовці ДНК, крім стандартного адаптера, до прикладу пришивається ще послідовність-індекс. Це зручно для секвенування невеликих геномів.

Секвенування спарених кінців (англ. Mate Pair Sequencing). Дозволяє секвенувати дві послідовності, що спочатку знаходяться в геномі на відстані до 5000 нуклеотидів один від одного, як єдине ціле. Такий підхід може бути корисний при *de novo* секвенуванні, при пошуку мутацій, для коректного складання геному.

Секвенування РНК. Секвенування РНК відрізняється від секвенування ДНК на стадії підготовки зразків. Якщо потрібно секвенувати тільки мРНК, то мРНК виділяють за наявності поліаденілування. Якщо необхідно секвенувати як мРНК, так і некодуючі РНК, то спочатку з клітини виділяють всі РНК, а потім рРНК видаляють хімічним способом. РНК фрагментують на ділянки по 100-200 нуклеотидів. На матриці РНК, за допомогою зворотної транскриптази синтезують комплементарний ланцюг ДНК (кДНК). На матриці отриманої ДНК синтезують комплементарний ланцюг ДНК. Далі процес секвенування РНК

збігається з секвенуванням ДНК - лігують адаптери і відпалюють на закріплених на підкладці праймерах.

За допомогою Illumina/Solexa можна як визначати послідовність мРНК, так і аналізувати повний транскриптом клітини. За допомогою РНК-секвенування можна вивчати альтернативний сплайсинг, алель-залежну експресію генів або шукати нові транскрипти.

Таблиця 6

Системи секвенування Illumina

Показники	HiSeq 2500/2000	HiSeq 1500/1000	HiScanSQ	Genome Analyzer IIx	MiSeq
Час аналізу	11 діб	8,5 діб	8,5 діб	14 дмб	39 год
Довжина читання	100 bp	100 bp	100 bp	150 bp	250 bp
Кількість читань	6 млрд	3 млрд	1,5 млрд	640 млн	34 млн
Якість секвенування Q30	>80 %	>80 %	>80 %	>70 %	>70 %

Перший секвенатор, випущений компанією Illumina, був Genome Analyzer 1G. На сьогоднішній день існує кілька моделей. Genome Analyzer IIx - найпопулярніший секвенатор нового покоління. HiScanSQ - поєднує в собі секвенатор і аналізатор для роботи з мікрочіпами. HiSeq 2500 та HiSeq 1500 можуть запускатися у двох різних режимах: високопродуктивне секвенування (багато коротких прочитань по 100 нуклеотидів) та швидке секвенування (мало довгих прочитань по 150 нуклеотидів).

Якість секвенування Q30 означає відсоток нуклеотидів, для яких ймовірність бути помилково визначеними менше 0,001.

Переваги та недоліки методу Illumina

У порівнянні з іншими методами секвенування нового покоління, метод Illumina найбільш високопродуктивний - 600 Gb за одне прочитання. Отже, вартість секвенування на 1 Gb інформації буде невелика. До позитивних особливостей можна віднести і точність за невеликої довжини прочитання.

Більшість помилок, що виникають при секвенуванні - неправильне визначення приєднаного нуклеотиду. Середня частота помилок становить 0,5% - одна помилка на прочитання довжиною 200 нуклеотидів. До недоліків можна віднести високу вартість приладів та невелику довжину прочитань (до 250 нуклеотидів).

Технологія SOLiD (англ. Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) SOLiD – це ще одна технологія секвенування нового покоління, створене компанією Life Technologies (<https://web.archive.org/web/20080516181322/http://solid.appliedbiosystems.com/>) та представлена на ринку в 2006 р.

Платформа SOLiD дозволяє секвенувати одночасно сотні мільйонів і навіть мільярди коротких послідовностей.

SOLiD базується на застосуванні метод лігювання на відміну від інших платформ, таких як Roche-454 або піросеквенування і Solexa (Illumina), які використовують секвенування за допомогою синтезу (полімеризації) ДНК-ланцюгів.

Використання цих методів секвенування нового покоління дозволило знизити вартість секвенування у 2006 р. до \$0.01 за одну нуклеотидну пару до приблизно \$0.0001 за п.н. і збільшити потужність з 1 млн п.н./секвенатор/день (2004 р.) до понад 5 млн п.н./секвенатор/день (2009 р.).

Загальні етапи, характерні більшості методів секвенування нового покоління, включають:

- фрагментацію геномної ДНК у рандомний спосіб (випадковим чином);
- іммобілізацію одноланцюгових фрагментів на твердих намистинах або плоскій твердій поверхні;
- ампліфікацію фрагментів ДНК на твердій підложці за допомогою ПЛР;
- власне секвенування та подальшу обробку даних кожного циклу *in situ* за допомогою сканування флуоресценції, хемілюмінесценції та інших методів.

Процес секвенування включає такі кроки:

Підготовка бібліотеки ДНК

Геномна ДНК розрізається на малі фрагменти. Потім до кінців кожного фрагмента пришиваються дві різні нуклеотидні послідовності-адаптери A1 і A2. У результаті бібліотеці виявляються одноланцюгові нуклеотидні послідовності A1-(фрагмент ДНК)-A2.

ПЛР в емульсійному середовищі

ПЛР ДНК-фрагментів бібліотеки проводять у водних краплях у олійно-водній емульсії. У кожній краплі міститься намистина (кулька) розміром 1 μm , до якої приєднані одноланцюгові нуклеотидні послідовності одного з двох праймерів (P1 або P2). Ці праймери (P1 та P2) комплементарні адаптерам A1 та A2 відповідно. У таку краплю олії додають послідовність з бібліотеки, і праймер на намистині утворюватиме дуплекс з одним з її адаптерів. Якщо на намистині міститься праймер P1, то дуплекс з ним утворює адаптер A1. Це фактично є відпаленням (гібридизацією) праймеру. Після відпалення праймеру додається ДНК-полімераза, яка добудовує другий ланцюг ДНК за принципом комплементарності. Після проведення ПЛР та дисоціації ДНК-дуплексів на бусинах залишаються одноланцюгові послідовності ДНК.

Насичення намистин цільовою ДНК

Насправді, лише 30% намистин несуть цільову ДНК (ДНК-фрагмент бібліотеки). Для збільшення кількості таких намистин додають до розчину інші великі полістиролові намистини, з приєднаними одноланцюжковими послідовностями іншого адаптеру (A2), комплементарного ПЛР-праймеру (P2). Так, кожна намистина з цільової ДНК складатиме пару з великою намистиною за рахунок утворення дуплексу: адаптеру A2 на великій намистині та ділянки, що відповідає праймеру P2, намистини з цільовою ДНК. Такий комплекс у результаті відокремлюють від «порожніх» намистин, а потім його плавлять, щоб

пройшла дисоціація намистин з цільовою ДНК та полістиролових намистин. Ця процедура дозволяє збільшити кількість намистин, що несуть цільову ДНК до 80%.

Потім 3'-кінці, що несуть послідовність P2, модифікують для забезпечення ковалентного зв'язування, необхідного на наступній стадії.

Перенесення намистин (рис. 24)

Продукти, отримані попередньої стадії, переносять на скляні пластини. Намистини іммобілізують на склі у випадковому порядку, приєднуючи їх ковалентно до скла через модифікації 3'-кінців на намистинах.

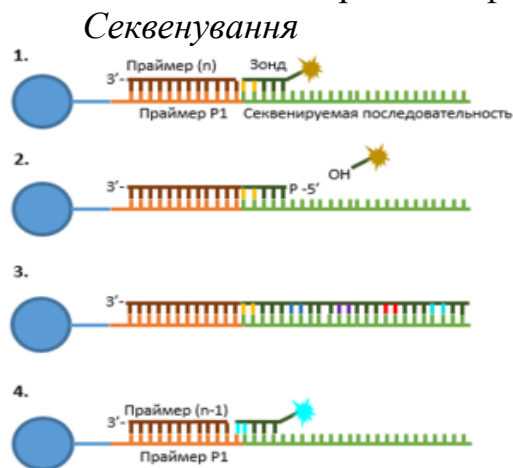


Рис. 24. Схема секвенування за платформою SOLiD.

(1) Початок 1 раунду: додавання праймеру довжини n та 8-ми нуклеотидного зонду, їх лігювання, детекція флуоресценції.

(2) Розрізання зонду, звільнення від мітки.

(3) 5 послідовних циклів 1 раунду (повтор стадій (1) та (2)).

(4) Початок 2 раунду: додавання праймеру довжини $n-1$ та 8-ми нуклеотидного зонда, лігювання їх один з одним, детекція флуоресценції.

Секвенування проходить за допомогою лігювання восьми-нуклеотидних зондів, мічених на 5'-кінці одним із чотирьох різних флуорофорів.

Послідовність зондів несе сайт гідролізу, що знаходиться між п'ятим та шостим нуклеотидами. Перші дві основи з 3'-кінця є комплементарними двом нуклеотидам секвенованої послідовності.

З третьої по п'яту основи зонда можуть гібридуватися з будь-якими трьома нуклеотидами секвенованої ДНК. 6-8-ма основи зонду також можуть гібридуватися з будь-якою послідовністю, однак вони разом із флуоресцентним барвником відщеплюються від зонду в ході реакції.

Відокремлення флуоресцентної мітки разом із основами 6-8 відбувається таким чином, що на 5'-кінці зонду залишається фосфатна група, що сприяє наступному циклу його лігювання. Так, дві основи кожного зонду суворо комплементарні основам послідовності, що аналізується, у позиціях $n+1$ і $n+2$, $n+6$ і $n+7$ і т. д.

Процес секвенування складається із п'яти раундів, кожен раунд складається з 6-7 циклів. Кожен раунд починається з додавання універсального праймеру довжини n , комплементарного P1. У кожному циклі 8-ми нуклеотидні зонди додаються та лігуються до праймеру, їх перші два нуклеотиди комплементарні двом нуклеотидам секвенованої послідовності. Потім утворені комплекси аналізу відмивають від залишків незв'язаних зондів, вимірюють рівні флуоресценції лігйованого зонда і розрізають його між п'ятою і шостою основами. Після закінчення останнього циклу проводять дисоціацію синтезованого ДНК-ланцюга від матриці, прикріпленої до намистини. Це

необхідно для того, щоб у наступному раунді використовувати нові порції праймеру та зонду. Праймери тепер беруть довжини $n-1$. Отже, протягом п'яти раундів використовуються праймери, комплементарні P1, різної довжини: n , $n-1$, $n-2$, $n-3$, $n-4$ щодо 3'-кінця P1. Таким чином, можна **секвенувати приблизно 25 нуклеотидів послідовності-аналіту**.

Читання даних (рис. 25)



Рис. 25. Кольорова матриця SOLiD.

Одним кольором кодується:

- пара нуклеотидів і вона ж у зворотному порядку (наприклад, CA та AC);
- пара нуклеотидів та комплементарна їй пара (наприклад, CA та GT);
- пара нуклеотидів та обернено комплементарна їй пара (наприклад, CA та TG).

Послідовність нуклеотидів може бути розпізнана як послідовність кольорів одним способом. Але послідовність кольорів може бути перетворена на послідовність нуклеотидів 4 різними способами. Це схоже на взаємовідповідність між нуклеотидами та амінокислотами внаслідок виродженості генетичного коду.

Для розшифрування послідовності нуклеотидів за кольорами необхідно знати один нуклеотид.

Преваги методу

За використання методу SOLiD кожен нуклеотид прочитується двічі, що підвищує точність секвенування. Відповідно, щоб припуститися помилки секвенування (пропустити SNP) необхідно обидва рази неправильно визначити колір флуоресцентної мітки при секвенуванні сусідніх нуклеотидів.

Полоні-секвенування (англ. polymerase colony — «полімеразна колонія») — інша технологія секвенування нового покоління (NGS) без електрофоретичного поділу, що дозволяє прочитувати мільйони коротких іммобілізованих послідовностей ДНК, дешевша порівняно з секвенуванням за методом Сангера.

Технологія була розроблена в лабораторії доктора Джорджа Черча (George McDonald Church) у Гарварді (Гарвардська медична школа). Порівняно з іншими методиками секвенування – полоні-секвенування проводиться на платформі з відкритим вихідним кодом та протоколами. Апаратна платформа даного методу може бути легко комбінована з широкодоступною епіфлуоресцентною мікроскопією та мікрофлюїдними системами під керуванням комп'ютера.

Основна ідея методу полягає в утворенні великої кількості унікальних 'полоній' (молекулярних колоній, згенерованих полімеразою), які секвенуються

У результаті інструментального обліку отримують дані щодо флуоресценції. Кольорова матриця включає спектр по 4 елементи. Кожен колір кодує 4 з 16 можливих динуклеотидів. Наприклад, "синій" колір флуоресцентної мітки відповідає парі однакових нуклеотидів (тобто AA, GG, TT або CC). Дизайн матриці перетворень кольору сприяє корекції помилок.

у випадковому порядку. Полоні-секвенування проводиться для бібліотеки парних кінцевих тегів або міток (paired-end tags): кожна молекула ДНК має довжину 135 п.н. (пар нуклеотидів), містить два теги (послідовності-мітки) довжиною 17-18 п.н., розділених та фланкованих загальною послідовністю. Поточна довжина прочитання цієї методики становить 26 п.н. для амплікону та 13 п.н. для тегу (на кожному тезі залишається непрочитана послідовність 4-5 п.н.).

Одномолекулярне секвенування

Перший метод секвенування поодиноких молекул, розроблений HeliScore (Helicos BioSciences), має продуктивність близько 1 Гб на добу. Принцип методу полягає у тому що після клональної ампліфікації зразку відбувається фрагментація ДНК з подальшим поліаденілюванням на 3'-кінці з подальшим секвенуванням, що чергується з промиванням зразків нуклеотидами з флуоресцентною міткою.

Секвенування на нанокульках

У даному методі до фрагменту ДНК, що секвенується, послідовно вносяться 4 адаптери, завдяки яким в ході подальшої реплікації Phi29 ДНК-полімеразою (rolling circle replication) синтезована молекула ДНК згортається з утворенням ДНК-нанокульок. Потім нанокульки наносяться на субстрат, що має численні поля розміром ~300 нм для зв'язування ДНК, організовані як решітки. Організація цих полів дозволяє вмістити більше ДНК на субстрат і збільшити густину інформації у зображенні порівняно з випадковим нанесенням ДНК на субстрат (наприклад, як у полоні-секвенуванні).

sPAL секвенування

Combinatorial probe anchor ligation – комбінований метод секвенування, що використовує комбінацію гібридизації та лігювання пулу зондів. Кожен зонд складається з дев'яти вироджених основ (які можуть бути будь-якими з чотирьох) у всіх, крім однієї позиції, яку збираються прочитати.

Цільова позиція позначена одним з чотирьох барвників, що відповідають кожній азотистій основі. На матриці гібридизують якірну послідовність, комплементарну адаптеру та зонди. Зонди, гібридизовані навпроти одного з кінців якірної послідовності, потім лігуються. Після гібридизації та лігування надлишок зондів змивають та знімають зображення. Потім змивають весь якірно-зондовий комплекс і повторюють процес, використовуючи зонди для інших позицій. Після зчитування 5 суміжних нуклеотидних залишків процес повторюється з використанням якорів з п'ятьма додатковими виродженими основами, що дозволяє секвенувати до 10 п.н. з кожного боку адаптеру. Загалом секвенується прочитання 70 п.н. з вихідного фрагмента, по 35 п.н. на кожному кінці адаптеру. Через відстань між адаптерами ці послідовності в 35 залишків не є суміжними, оскільки вони містять пробіли довжиною 2 та 5 п.н.

Ion Torrent Sequencing

Метод заснований на зв'язку між хімічною та цифровою інформацією, також ця технологія називається pH-індукованим секвенуванням. Процес заснований на детекції протонів, що виходять при синтезі ланцюга ДНК як

побічний продукт. Як наслідок, рН розчину змінюється, яку можна відповідним чином детектувати.

Платформа Ion Torrent відрізняється від інших технологій секвенування тим, що в ній не використовуються модифіковані нуклеотиди та оптичні методи. Метод Ion Torrent дозволяє досліджувати транскриптоми, малі РНК, проводити ChIP-seq. Більш того, за його допомогою можна вивчати геноми мікробних консорціумів (біоплівки тощо).

Одномолекулярне секвенування у реальному часі Pacific Biosciences

Поява методу одномолекулярного секвенування в реальному часі (англ. Single molecule real time sequencing, SMRT) дало можливість спостерігати за роботою ДНК-полімерази, що нарощує ланцюг, який синтезується, в реальному часі. Суть методу полягає у визначенні нуклеотидної послідовності фрагментів геномної ДНК з лігованими до їх кінців специфічними ДНК-адаптерами, необхідними для подальшого секвенування. Сенса SMRT-секвенування схожий з описаними раніше методами NGS - ДНК-полімераза добудовує другий ланцюг досліджуваної молекули ДНК, використовуючи нуклеотиди, мічені різними флуоресцентними мітками, які реєструють за допомогою конфокальної мікроскопії високої роздільної здатності.

Нанопорове секвенування - сімейство високоефективних методів секвенування ДНК або РНК третього покоління [1]. Метод заснований на використанні білкових, твердотільних або інших пор діаметром кілька нанометрів, чутливих до нуклеїнових кислот.

Нанопорове секвенування

Нанопорове секвенування дозволяє уникнути стадій ПЛР-ампліфікації та хімічного мічення зразка ДНК або РНК. Це є суттєвою перевагою порівняно з іншими методами секвенування, які використовують хоча б одну з цих стадій. Можливості методу включають відносно дешеве генотипування, високу мобільність, швидкий аналіз та відображення результатів у реальному часі. Було описано використання методу швидкого виявлення вірусних патогенів, відстеження бактеріальної резистентності, секвенування геному людини, тварин і рослин, гаплотипування та інших областях досліджень.

У 1989 р. було продемонстровано створення альфа-токсином, синтезованим золотистим стафілококом, каналів (нанопор) у штучній фосfolіпідній мембрані.

У 1995 р. вперше була запропонована ідея нанопорового секвенування - визначення властивостей лінійного полімеру при його проходженні через пору мембрани. При проходженні через пору полімер певним чином із нею взаємодіє, що дозволяє визначити його властивості. Через рік, у 1996 р., з'явилася перша робота, що описує можливість застосування нанопор (як нанопор був використаний альфа-гемолізін) для визначення характеристик нуклеїнових кислот.

У 1999-2000 рр. було показано, що, використовуючи, як нанопори альфа-гемолізін стафілококу, можна відрізнити одноланцюгову РНК від одноланцюгової ДНК.

У 2001 р. вперше було проведено роботу, в якій за допомогою нанопор визначали наявність коротких послідовностей ДНК. Тільки у 2009 р. вдалося показати можливість розрізняти нанопорами всі нуклеотиди в послідовності ДНК, що показало перспективність впровадження цього підходу для секвенування ДНК-молекул.

У 2012 р. компанією Oxford Nanopore Technologies були продемонстровані перші нанопорові секвенатори: GridION та MinION.

Тоді ж була показана важлива можливість застосування даного методу - був секвенований геном бактеріофага phiX довжиною 5,4 т.п.н.

Нанопорова система представляє собою реакційну камеру, розділену на дві частини мембраною, що містить отвір - нанопору. До частин камери подають електричну напругу, внаслідок чого досліджувані молекули проходять через пору за напрямком дії електричного поля.

При проходженні молекул нуклеїнових кислот через пору окремі нуклеотиди впливають на той чи інший параметр системи, що дозволяє визначити послідовність нуклеотидів. У практиці нанопорового секвенування використовують камеру, заповнену електролітичним розчином, і вимірюють силу струму іонів, що протікає через пору під дією електричного поля. При проходженні нуклеотидів через пору вони зменшують просвіт, доступний для іонів, і сила струму падає, що реєструється приладом.

Варіанти нанопорового секвенування

Залежно від того, чи зберігають молекули нуклеїнових кислот, що секвенуються, свою хімічну цілісність, виділяють два варіанти — секвенування цілих ланцюжків та екзонуклеазне секвенування .

Секвенування цілих ланцюжків

При використанні цієї модифікації методу ланцюги нуклеїнових кислот не розщеплюються. Перенесення цілих молекул ДНК і РНК через пору може здійснюватися такими способами:

А) Транспорт під впливом напруги. Оскільки ДНК і РНК несуть у собі негативний заряд, то найпростішим способом транспорту молекул нуклеїнових кислот через пору є їх електрофоретичне перенесення разом із іонами. Проблемою даного методу є те, що для вимірювання падіння струму іонів через пору спочатку потрібно великий струм, щоб отримати хороше співвідношення цільового сигналу та базових шумів. Водночас, при збільшенні прикладеної напруги збільшується і швидкість руху, з якою молекула нуклеїнової кислоти долає пору, а отже, зменшується час розпізнавання кожної окремої основи, через що якість розпізнавання суттєво знижується.

Б) Транспорт цільових молекул під дією напруги із розплетенням дуплексів. Зменшити швидкість проходження одноланцюгової ДНК через пору можна, утворюючи на ній дволанцюгові ділянки за допомогою комплементарних фрагментів ДНК. Тоді в ході транспорту відбуватиметься розплітання даної ділянки, що дозволить довше затримувати окремі нуклеотиди в порі, підвищуючи якість отриманого сигналу. Тим не менш, оскільки розплетення відбувається не покроково, не понуклеотидно, то час затримки нуклеотиду в порі не є незмінним для всієї послідовності.

В) Транспорт із використанням ферментів. Для того, аби кожен нуклеотид затримувався в порі на фіксований час, можна використовувати різні ферменти, які пропускатимуть нуклеотиди через пору по одному. Прикладом такого ферменту є ДНК-полімераза. За рахунок прикладеної напруги комплекс до пори спочатку притягуються фермент. Але тепер, перш ніж черговий нуклеотид молекули ДНК пройде через пору, має відбутися один крок синтезу другого, комплементарного, ланцюга ДНК. Затримка, що виникає при цих реакціях усередині пори, дозволяє більш точно розрізняти поодинокі нуклеотиди.

Екзонуклеазне секвенування

За даного методу ланцюг нуклеїнової кислоти нарізається на одиничні нуклеотиди екзонуклеазою, розташованою в безпосередній близькості до пори. Під впливом поля негативно заряджені нуклеотиди самостійно потрапляють у пору, де відбувається визначення нуклеотидних залишків.

Переваги та недоліки нанопорового секвенування

Порівняно з іншими методами секвенування, застосування нанопорового секвенування має переваги, такі як дешевизна і простота використання (за рахунок відсутності необхідності приготування зразка та використання реактивів), висока чутливість (аж до секвенування без ампліфікації ДНК з крові та слини), значна довжина прочитань (аж до десятків тисяч підстав), мобільність, швидкість аналізу та відображення результатів у реальному часі.

До недоліків методу можна віднести такі властивості, як низька якість прочитань у порівнянні з технологіями секвенування з короткими прочитаннями (проте дана ситуація змінюється на краще при появі нових алгоритмів і модифікацій приладової бази), втрата функціональних властивостей біологічних пір з часом (пори надійно працюють лише протягом певної кількості прогонів) та вплив факторів довкілля на швидкість читання послідовності і, отже, на його якість (моторний білок може працювати лише з достатньою швидкістю у певному діапазоні рН, при цьому недостатньо швидко працюючи за межами діапазону).

Oxford Nanopore Technologies. У лютому 2012 р. на конференції AGBT у Флориді компанія Oxford Nanopore Technologies представила прототипи двох платформ для високопродуктивного секвенування довгих фрагментів, що ґрунтуються на нанопоровому секвенуванні цілих ланцюжків: GridION та MinION. Як демонстрацію був секвенований геном бактеріофага PhiX довжиною 5386 п.н. Станом на 2020 р. компанія випускає кілька пристроїв. Усі вони дозволяють аналізувати дані реальному часу.

MinION

MinION (рис. 26) - секвенатор невеликого розміру з одноразовою ячейкою, спроектованою для використання в домашніх умовах, із орієнтованою ціною близько 900 \$. Секвенатор має роз'єм USB 3.0 для підключення до комп'ютера. Містить 512 нанопор зі схожими характеристиками. Ячейка дозволяє відсеквенувати до 30 мільйонів п.н. ДНК (приблизно дві доби можна оцифрувати 10—20 мільйонів п.н. ДНК).

У 2019 р. компанія почала випускати Flongle — адаптор до MinION або GridION, який дозволяє працювати з менш продуктивними (~1 Gb, 126 нанопір замість 512), але з суттєво дешевшими (\$90) ячеекми [35].



Рис. 26. Секвенатор MinION.

GridION

GridION - пристрій, спроектований для повногеномного секвенування (по суті - MinION зі збільшеною продуктивністю). Прототип мав 2000 окремих нанопор, кожна з яких здатна отримувати прочитання довжиною до 5100 п.н. зі швидкістю 150 мільйонів п.н./год. протягом 6 годин. GridION Mk1 коштує \$49,955 і містить 5 незалежних ячеек. За його допомогою за один експеримент можна відсеквенувати до 150 мільйонів п.н. ДНК.

PromethION

Найбільш високопродуктивний секвенатор цієї компанії дозволяє секвенувати за один експеримент кілька трильйонів п.н. ДНК-ланцюга. PromethION 24 містить 24 ячеек і здатний за три доби оцифрувати 3,8 трильйонів п.н. ДНК, PromethION 48 містить 48 ячеек і здатний за три доби оцифрувати 7,6 трильйонів п.н. ДНК. Ячеек цього секвенатора містять 3000 нанопор. Потік даних з такою кількістю нанопор неспроможна аналізувати звичайним комп'ютером, для використання цього секвенатора необхідний суперкомп'ютер (втім, якщо запускати лише одну ячееку, то впорається і звичайний комп'ютер).

Інші розробки

Компанія планує випустити ще два пристрої: SmidgION - секвенатор, який підключається до смартфона, і Flongle - секвенатор, який містить 96 незалежних, але малопродуктивних ячеек, і, відповідно, розрахований на часткове секвенування великого обсягу коротких ДНК-молекул.

Аналіз даних секвенування

Отримані за допомогою секвенування послідовності застосовують з метою аналізу їх відповідності до видоспецифічних локусів, варіабельності чи

аутентичності напрацьованих фрагментів. Більшість вказаних досліджень ґрунтується на застосуванні методів філогенетичного аналізу.

Аналіз генетичних послідовностей є важливою частиною їх глибокого дослідження, інструментально забезпечуваною широким спектром засобів та інструментів *біоінформатики*.

Початковий етап розвитку біоінформатики, присвячений аналізу нуклеїнових кислот виникає з того, як у 1977 р. Був секвенований геном фагу Phi-X174. Поступовий розвиток методів аналізу нуклеотидних послідовностей ДНК призвів до охарактеризування все більшого числа розшифровки геномів все більшого числа організмів. Ці дані були збережені у відповідних базах даних. Вони використовуються для визначення послідовностей білків і регуляторних ділянок. Порівняння генів у рамках одного або різних видів організмів живого світу (вірусів, бактерій, грибів, рослин, тварин та людини) може продемонструвати схожість функцій білків або відношення між видами (таким чином, можуть бути складені філогенетичні дерева).

Зростання обсягів отриманих даних вже давно унеможливило їх аналіз вручну. На сьогодні для пошуку певних послідовностей у геномах тисяч організмів, що складаються з мільярдів пар нуклеотидів, використовуються комп'ютерні програми.

Ці програми дозволяють однозначно зіставити («вирівняти») схожі послідовності ДНК у геномах різних видів.

Часто такі послідовності несуть схожі функції, а відмінності виникають у результаті точкових або незначних мутацій, таких як заміни окремих нуклеотидів, вставки нуклеотидів і їхнє «випадання» (делеції).

Один з варіантів такого вирівнювання застосовується при самому процесі секвенування. Так звана техніка «дробового секвенування» (яка, наприклад, використовувалася Інститутом генетичних досліджень для секвенування першого бактеріального геному *Haemophilus influenzae*) замість повної послідовності нуклеотидів дозволяє розшифрувати послідовності коротких фрагментів ДНК завдовжки близько 600–800 п.н.

Кінці цих фрагментів накладаються один на одного і, за суміщення належним чином, дають повний геном. Такий метод швидко дає результати секвенування, але збірка фрагментів може бути досить складним завданням для великих геномів. У проекті з дешифровки геному людини збірка послідовностей зайняла декілька місяців часу роботи суперкомп'ютерів. Зараз цей метод застосовується для практично всіх геномів, і алгоритми збірки геномів є однією з щонайгостріших проблем біоінформатики на сьогоднішній момент.

Іншим прикладом застосування комп'ютерного аналізу послідовностей є автоматичний пошук генів та регуляторних послідовностей у секвенованих геномах. Не всі нуклеотидні послідовності в геномі кодують білкові послідовності. Наприклад, у геномах еукаріот існують великі сегменти некодуючих ДНК, які не кодують білки, а їхня функціональна роль в багатьох випадках невідома. Розробка алгоритмів виявлення ділянок геному, що кодують білки, є важливим завданням сучасної біоінформатики.

Біоінформатика допомагає зв'язати геномні та протеомні дослідження, наприклад, допомагаючи у використанні послідовності ДНК для ідентифікації білків.

Анотація геномів.

У контексті геноміки анотація геномів – це процес маркування генів і інших послідовностей в ланцюгу геномної ДНК. Перша програмна система анотації геномів була створена в 1995 р. Оуеном Вайтом (Owen White), що працював над аналізом геному бактерії *Haemophilus influenzae*. Ці дослідження дозволили побудувати систему знаходження генів, тРНК і інших складових субодиниць в геномі, і зробити перші позначення функцій цих елементів геному. Більшість сучасних систем працюють схожим чином, але створювані для цього програми постійно розвиваються і поліпшуються.

Обчислювальна еволюційна біологія.

Еволюційна біологія досліджує появу та походження видів живих організмів, а також їх розвиток в часі. Інформатика допомагає еволюційним біологам в декількох аспектах:

- вивчення еволюції великого числа організмів за визначенням змін у їх геномах, а не лише за будовою або фізіологією;
- порівняння цілих геномів, що дозволяє вивчати більш комплексні еволюційні події, зокрема дуплікацію генів, їх горизонтальний перенос, і передбачення факторів спеціалізації організмів;
- створення комп'ютерних моделей популяцій задля передбачення поведінки систем у часовому вимірі;
- відстеження появи публікацій в генетичних базах даних, що містять інформацію про велику кількість видів.

Область інформатики, що використовує генетичні алгоритми, часто плутають з комп'ютерною еволюційною біологією. Робота в цій області використовує спеціалізоване програмне забезпечення для поліпшення алгоритмів і обчислень, ґрунтується на еволюційних принципах, таких, як реплікація, диверсифікація через рекомбінації та мутації, і виживання за умов природного відбору.

Оцінка біологічного розмаїття.

Біорізноманіття екосистем може бути визначено як повна генетична сукупність певного середовища, що складається зі всіх видів, котрі мешкають в ньому. Спеціалізоване програмне забезпечення при вивченні біорозмаїття застосовується для пошуку, візуалізації, аналізу та поширення інформації. За допомогою засобів комп'ютерної симуляції можна моделювати популяційну динаміку, або обчислювати загальне генетичне здоров'я в біоценозах або в культурі біосистем. Це дозволяє проводити аналіз послідовностей ДНК організмів або повних геномів цілих вимираючих видів, дозволяючи запам'ятати результати генетичного експерименту і використовувати знову в майбутньому генетичну інформацію навіть після їх повного вимирання.

Аналіз експресії генів.

Експресія багатьох генів може досліджуватися за допомогою рівнів активності мРНК з використанням методів ДНК-мікрочипів, експресії мічених

послідовностей (EST), серійного аналізу експресії генів (SAGE) або інших варіантів мультиплексної гібридизації *in-situ*.

Всі ці методи надзвичайно сприятливі до дії різного розу інгібіторів та різних факторів, що потенційно зумовлюють упередженість у отриманих значеннях, тому важлива область досліджень у біоінформатиці займається розробкою статистичних інструментів для розділення сигналу і шуму в прикладних генетичних дослідженнях.

Ці дослідження часто використовуються для виявлення генів, що зумовлюють хвороби, або задіяні в їх виникненні та розвитку: наприклад, дані мікрочипів ракових епітеліальних клітин порівнюють з нормальними для визначення підвищуючої та понижуючої регуляції генів в ході розвитку патпроцесу.

Бази даних.

Бази даних із біологічною інформацією необхідні для більшості біоінформатичних досліджень. Існує велика кількість таких баз, що містять як нуклеотидні послідовності, так і описи видів, а також фенотипів. Багато із них перебувають у вільному доступі, доступ до інших може бути обмежений чи закритий.

Прикладом баз даних з інформацією про нуклеотидні послідовності є GenBank, DDBJ та ENA (European Nucleotide Archive), які мають вільний доступ. Ці бази даних сформовані і підтримуються в рамках Міжнародної співпраці баз даних нуклеотидних послідовностей (International Nucleotide Sequence Database Collaboration).

Станом на серпень 2014 року GenBank містив 939 775 079 106 пар основ. Інші бази даних більш специфічні, наприклад, присвячені окремому типу генів чи білків (таких як кінази), окремій хромосомі чи органелі або організму. В деяких базах зібрані послідовності об'єднані спільною ознакою, наприклад Pfam (Protein Family) містить кілька тисяч родин гомологічних білків.

Бази даних літератури містять бібліографічні дані статей, присвячених біологічних дослідженням і посилання на повні тексти статей, одним із найважливіших таких сховищ є MEDLINE.

Філогенетика – це частина загальнобіологічної систематики, задачею якої є ідентифікація еволюційних відносин біологічних видів. Філогенетика вивчає походження видів, штамів і генотипів живих організмів.

Філогенетичний аналіз базується на дослідженні візуалізованих зв'язків груп організмів що досліджуються, які узагальнюють у вигляді філогенетичних дерев (дендрограм) – графічних зображень філогенетичних зв'язків організмів, яке відображає характер спорідненості організмів, що є об'єктами дослідження, за допомогою кладистичних методів. Крім кладистичних методів є фенетичні методи філогенетичного аналізу (методи кількісної оцінки показників спорідненості організмів).

Продуктами філогенетичного аналізу є філогенетичні дерева – графічні схеми, які описують ступені спорідненості аналізованих об'єктів, базуючись на нуклеотидних послідовностях їх генетичного матеріалу. Вони можуть бути вкоріненими (для порівняння властивостей групи організмів, що аналізують,

використовують гетерологічний таксон) та не вкоріненими (порівняння проводиться лише в середині групи). Філогенетичне дерево має корінь (якщо є вкоріненим). Крім кореня в ньому присутні елементи гілкування: лінії, сублінії, групи, підгрупи – клади (групи мікро- або макроорганізмів, чиї послідовності поєднані філогенетично) та вузли – місця гілкування (рис. 27).

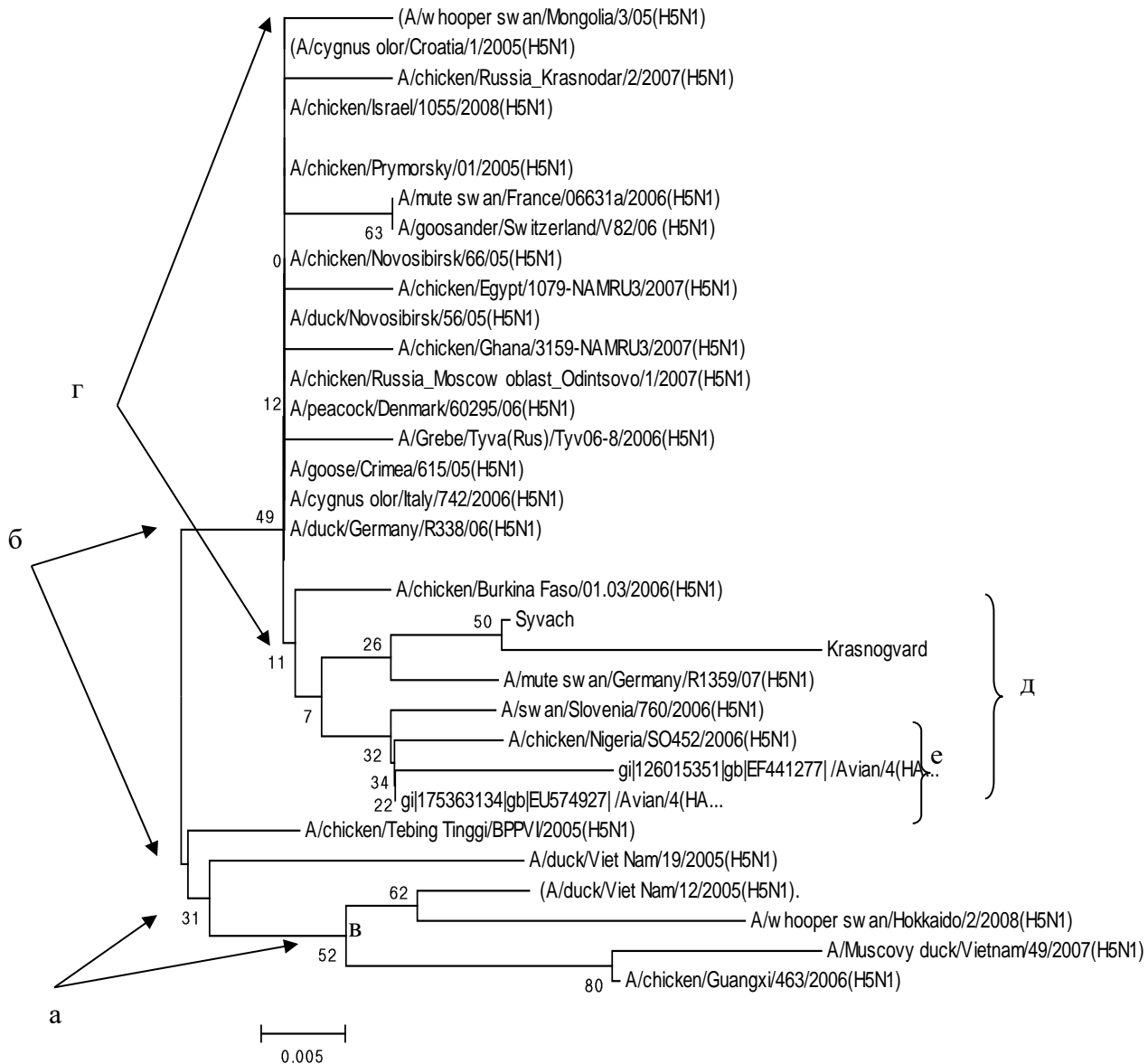


Рис. 27. Невкорінене філогенетичне дерево класичного типу: а – індекс повторень, б – лінії, в – вузол, г – сублінії, д – група, е – підгрупа.

Для проведення філогенетичних кладистичних досліджень послідовностей ДНК існує кілька матриць порівняння, які покладені в основу аналізу. До їх числа відносяться методи: максимальної схожості [maximal likelihood], максимального прорахунку [maximal parsimony], мінімальної еволюції [minimal evolution], метод найближчого сусіда [neighbor joining] і ряд інших.

Матриця максимальної схожості [maximal likelihood, ML] – різновид кладистичної матриці порівняння, який заснований на статистичній обробці багатьох дендрограм. Вона здебільшого використовується з метою вивчення еволюційних зв'язків між об'єктами дослідження.

Матриця максимального прорахунку [maximal parsimony, MP] – різновид кладистичної матриці порівняння, що заснований на статистичній обробці багатьох дендрограм із залученням групи методів мінімальної площини та схожості. Використовується з метою вивчення еволюційних зв'язків між об'єктами дослідження.

Матриця попарного порівняння – це математична модель прорахунку нуклеотидних відмінностей між послідовностями різних штамів чи видів мікроорганізмів, що базується на покроковому порівнянні елементів нуклеїнової кислоти та визначенням дистанції між ними у різних представників вибірки. Існує кілька алгоритмів попарного порівняння, які використовуються програмним забезпеченням для побудови дендрограм.

Метод мінімальної еволюції [minimal evolution, ME] являє собою різновид кладистичної матриці порівняння, що базується на непараметричній статистичній обробці дерев з визначенням дистанції між елементами послідовностей. Критерієм вірогідно правильно збудованої дендрограми є відстань між її гілками.

Метод найближчого сусіда [neighbor joining, NJ] – найбільш поширений у кладистичному аналізі патогенів. Він являє собою різновид кладистичної матриці порівняння, який заснований на статистичній обробці з інтеграцією методів мінімальної площини та схожості. Цей шлях розрахунків є спрощеним аналогом алгоритму максимальної схожості.

Поняття мінімальних площин являє собою показник матриці філогенії, що показує статистичну достовірність побудови дендрограм. Найкращими є дендрограми, які показують мінімальну різницю (статистичний показник мінімальної площини) між показником попарних відстаней послідовностей та характером їх топографії на філогенетичному дереві.

Матеріалом для дослідження за допомогою методів філогенетичного аналізу служать секвеновані ділянки вірусних і бактерійних ДНК або РНК довжиною не менше 200 п.н. Секвеновані послідовності для первинної обробки та коригування застосовують як окремі файли, записані у вигляді двох груп документів: перша – у форматі текстових документів (*.txt), а друга – файли хроматограм автоматичного секвенсу (*.seq, *.ABI).

Для коригування послідовностей з бази даних GenBank завантажують типову послідовність секвенованого гена (послідовність ДНК або кДНК, отримана з геномної РНК, збудника відповідного виду, ізольованого та секвенованого у тій самій географічній зоні, що й збудник – об'єкт дослідження). Послідовності завантажують з баз даних GenBank та інших. Критеріями пошуку при цьому є назва збудника латиницею, відповідно до міжнародної номенклатури, та назва гена, який аналізують. Після виконання пошуку серед знайдених посилань обирають таке, яке б відповідало критеріям типової послідовності та зберігають її для застосування в подальших дослідженнях.

Аналіз і коригування секвенованих послідовностей проводиться за допомогою спеціалізованого біологічного програмного забезпечення з опціями читання хроматограм секвенсу та множинного вирівнювання.

Вирівнювання секвенованих послідовностей проти типових дозволяє оцінити відповідність між ними за кожним нуклеотидом, виявити та позбутися можливих неточностей та ідентифікувати нуклеотидний склад позицій, що дали дефектні області в хроматограмах. Після коригування кожної з послідовностей їх аналізують вже у вигляді текстових файлів. У разі наявності нерозпізнаних ділянок ДНК (кДНК) зразки матеріалу, з яких отримані послідовності, необхідно секвенувати повторно.

Матеріалом для побудови множинного вирівнювання секвенованих послідовностей нуклеїнових кислот бактерій та вірусів для філогенетичного аналізу є вибірка коригованих секвенованих послідовностей, вибірка послідовностей гена, що аналізується, цього ж збудника у кількості від 10 шт., які належать ізолятам з різних частин світу, та послідовність-поляризатор (послідовність від генетично спорідненого виду, або ізоляту того ж виду (у випадку, коли досліджуються швидкомутуючі віруси) – попередника сучасної генерації).

Існує декілька напрямностей філогенетичного аналізу, у залежності від яких можуть видозмінюватись методи порівняння та матеріал, тобто послідовності, що застосовують для нього. Так, у випадку аналізу генотипової, патотипової або серотипової належності вірусів і бактерій, чиї ДНК (кДНК) були секвеновані, вибірка послідовностей для аналізу здійснюється таким чином, щоб кожний з генотипів, патотипів або серотипів був представлений принаймні 3–5 секвенованими послідовностями.

При дослідженні еволюції збудника вибірка послідовностей для аналізу здійснюється таким чином, щоб було представлено як мінімум 3-5 секвенованих послідовностей кожного року виділення.

Для встановлення видової належності збудника за консервативними видоспецифічними ділянками геномів вибірка послідовностей для аналізу здійснюється таким чином, щоб кожний з видів був представлений групою секвенованих послідовностей.

При аналізі походження збудника з епізоотологічної точки зору вибірка послідовностей для аналізу здійснюється таким чином, щоб представити 2–3 секвеновані послідовності найближчих років виділення від ізолятів з кожного географічного регіону, звідки потенційно ймовірним був занос інфекції.

Усі послідовності для філогенетичних досліджень отримують з міжнародних баз даних. З метою проведення множинного вирівнювання секвеновані кориговані послідовності, послідовності для порівняння та послідовність-поляризатор завантажують до спеціалізованого біологічного програмного забезпечення з опціями читання хроматограм секвенсу та множинного вирівнювання, після чого аналізують за допомогою програмного модулю Clustal з використанням глобального алгоритму вирівнювання, результати якого, у свою чергу, застосовують для створення дендрограм.

Побудова дендрограм здійснюється за допомогою спеціалізованого біологічного програмного забезпечення, зокрема, SeqProgs, PHYL, MEGA, TreeGen та інші. Нами опрацьовано та широко використовується програма

MEGA 4.1, яка міститься у вільному доступі в мережі Internet і може без обмежень бути застосована для проведення подібних робіт.

Програма MEGA 4.1 придатна для досліджень за алгоритмами NJ, ME та MP. При цьому вона має додаткові настроювані параметри аналізу: залучення до аналізу артефактних зон (інтервалів, порожнин тощо), делецій, поетапного аналізу (I, II, III та некодуєцької нуклеотиди), модель належності (складається з аналізу трансверсійних і транзиційних замінів, вибору методу обрахунку та обчислення патернів ліній), наявності чи відсутності повторень необхідних для статистичної обробки отримуваної інформації (число bootstrap).

При виборі методу порівняння необхідно керуватись потребами дослідження: алгоритм NJ здебільшого застосовують з метою визначення характеру нуклеотидних відмінностей між секвенованими нуклеїновими кислотами; алгоритм MP використовують при дослідженні з метою виявлення еволюційних зв'язків між мікроорганізмами та визначення їх кількості, чий послідовності аналізують; алгоритм ME також використовують при дослідженні з метою виявлення еволюційних зв'язків між мікроорганізмами без визначення їх статистичної достовірності.

При дослідженні еволюційних зв'язків між вірусами та бактеріями обов'язково необхідно використовувати послідовність-поляризатор.

NJ-алгоритм передбачає обчислення за наступною схемою: базуючись на показниках дистанції від матриці обчислюють матрицю Q за формулою:

$$Q(i, j) = (r - 2)d(i, j) - \sum_{k=1}^r d(i, k) - \sum_{k=1}^r d(j, k) \quad , \quad (1)$$

де Q – матриця Q, r – матриця залежного таксону, а d – відстань між таксонами i та j .

Далі знаходять пару таксонів з найменшим числом матриці Q та створюють вузол дендрограми, що показує близькість цих таксонів, розраховують відстань від кожного таксону до вузла дендрограми, розраховують відстань інших таксонів до цього вузла. Запускають обрахунок знову та знову, поки всі дистанції не будуть обчислені.

За результатами проведених програмою розрахунків отримують графічне зображення, яке називається дендрограмою (філогенетичним деревом). Для дослідження структури дендрограми оцінюють попарні відстані між компонентами вибірки, що аналізується. Отримані при цьому результати представлені у вигляді таблиці та відображають відстань між всіма послідовностями. Крім відстаней аналізують топографію дендрограми. На цьому етапі дослідження, у залежності від напрямку та задач дослідника, обирають ту чи іншу графічну модель дендрограми.

Основним режимом перегляду дерева є класичне або традиційне дерево, яке являє собою вертикально розташоване гілкування. Це дерево може бути побудоване вкоріненим чи не вкоріненим у залежності від параметрів аналізу та завдань дослідження. Дендрограми класичного типу використовують для оцінки ступеня еволюції мікроорганізма, філогенетичних зв'язків між штамми, встановленні виду, генотипу, патотипу, серотипу збудника.

Критерієм достовірності топографії отриманої дендрограми є індекси повторень (bootstrap), які показують відсоткову долю повторень топографії елементів гілкування при множинному аналізі розрахованих філогенетичних дерев. Показник індексу повторень розташований у зонах вузлів гілкування, його вважають задовільним у разі, коли це число становить (65 ± 5) і вище. Таким показник може і не бути у випадках, коли компоненти для побудови дендрограми мають різну довжину, або є надто короткими. У таких випадках говорять про «тенденцію до тієї чи іншої топографічної конформації».

Дендрограми класичного типу аналізують наступним чином: визначають кількість ліній (при наявності послідовності-поляризатора), кількість субліній, груп і підгруп. Далі знаходять на дендрограмі власні послідовності та вказують їх топографію і належність до того чи іншого кладу. Перед дослідженням укорінених дендрограм послідовність-поляризатор знаходять, виділяють та активують опцію «провести вкорінення» (place root) (рис. 28).

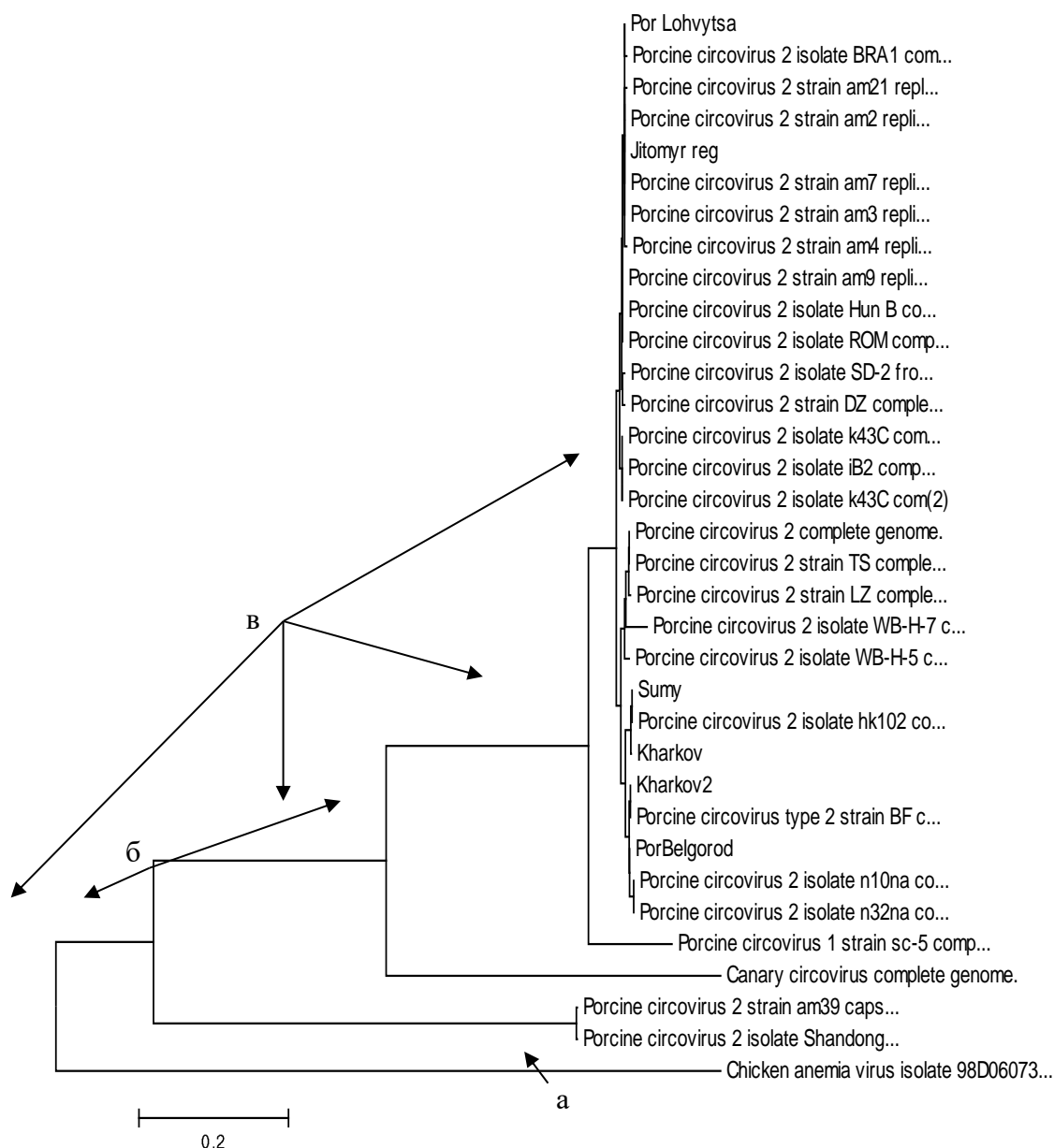


Рис. 28. Укорінене філогенетичне дерево класичного типу: а – корінь, б – вузол, в – гілка.

На отриманому дереві знаходять вузли гілкування на великі кластери та ідентифікують їх як лінії, проводять ідентифікацію більш дрібних кластерів у складі ліній та визначають сублінії, всередині субліній – групи та підгрупи в групах. Описують їх кладистичну належність, тобто групу та підгрупу кожної з доданих послідовностей, які аналізують, ступені дивергенції (межі відстаней в середині групи) та відстань того чи іншого компонента від груп послідовностей, до яких він не належить.

Для дослідження циркуляції генотипів чи видів вірусу за секвенованими послідовностями місцевих ізолятів обирають режим перегляду радіальне або циркулярне дерево (рис. 29).

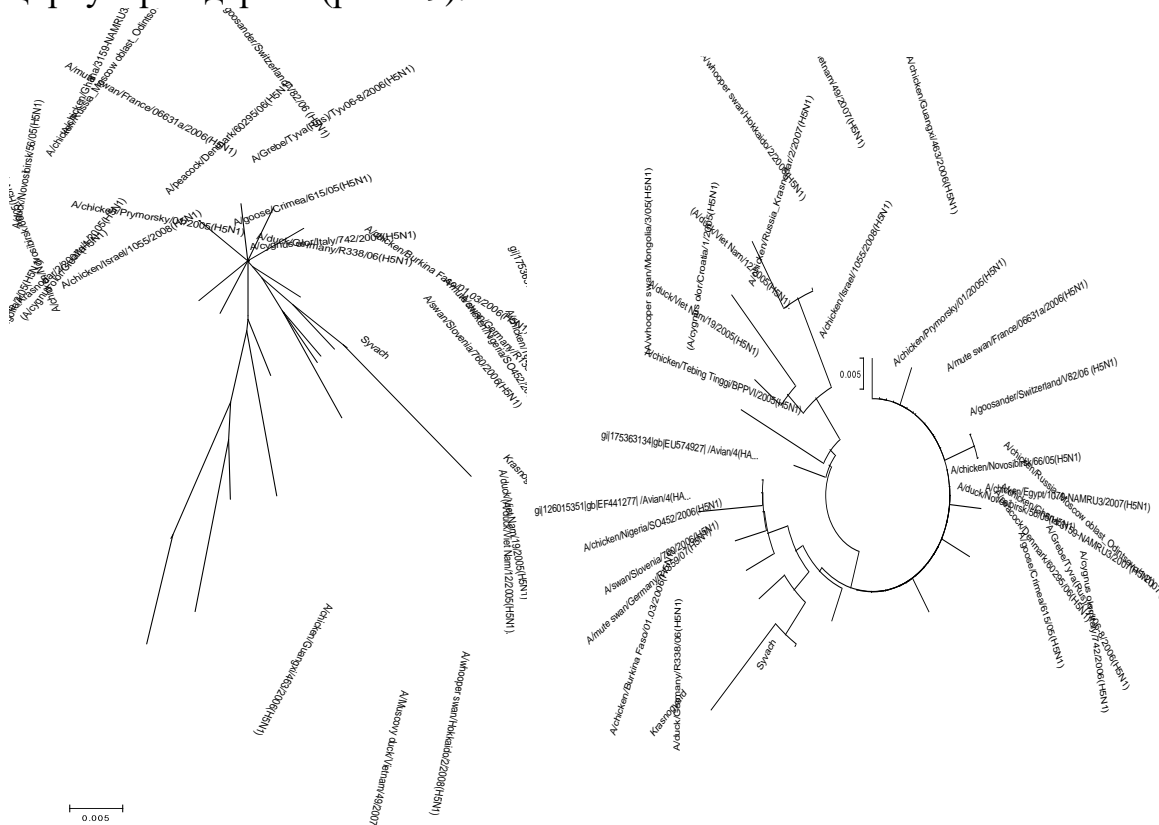


Рис. 29. Невкорінені філогенетичні дерева радіального (ліворуч) і циркулярного (праворуч) типу.

При аналізі еволюції збудника встановлюють найближчих філогенетичних родичів за мінімальним відсотком нуклеотидних відмінностей між послідовністю-аналітом і типовою послідовністю, на основі чого визначають штам-попередник аналізу. При аналізі дендрограми за алгоритмом ME філогенетичним попередником аналізу є штам чи вид мікроорганізму, від якого аналіт різниться в бік збільшення довжини гілки в межах єдиного кластеру. За результатами дослідження робиться висновок про еволюційне походження аналізу.

У випадку визначення видової належності за секвенованими консервативними ділянками кластерна належність аналізу відповідає виду.

При дослідженні походження збудника з епізоотологічної точки зору топографічно виявляється найбільш близький за ознакою кластерної належності до аналізу ізолят збудника, виділений впродовж найближчих років у країні,

звідки потенційно ймовірним є занос інфекції. За результатом дослідження встановлюють джерело засосу збудника на територію держави або місцевості.

Підсумовуючи вище сказане, необхідно відмітити, що вказані методи сьогодні є основою всіх досліджень з вивчення біології патогенів, епізоотичного процесу, патогенезу інфекцій тварин. Їх застосування авторським колективом надало змогу визначити генотипи вірусів ньюкаслської хвороби, цирковірусу свиней, пестивірусів та інших, а також дослідити аспекти молекулярної епізоотології вказаних інфекцій.

Особливості аналізу даних MinION

Пост-обробка даних, отриманих за допомогою Oxford Nanopore

Після використання Oxford Nanopore на виході є сирі дані формату FAST5. Формат FAST5, що використовується Oxford Nanopore, — це варіант стандарту HDF5 з ієрархічною внутрішньою структурою, призначеною для зберігання метаданих, пов'язаних із послідовністю ДНК та подій (агреговані вимірювання загального струму), попередньо оброблених робочим пристроєм. Результати обробки відображаються у реальному часі у графічному інтерфейсі MinKNOW, а дані записуються у форматі файлів FASTQ або .fast5.

Далі потрібно зробити розпізнавання нуклеотидів (Base calling). Цей процес обробить сирі дані формату FAST5 у форматі FASTQ (у програмі MinKNOW цей процес можна запустити під час прочитання рідів). Також можна використовувати такі програми, як poreTools, Guppy.

Далі потрібно очистити отримані послідовності, щоб позбавитися даних із занадто великим шумом. Для цього завдання використовується, наприклад, програма NanoFilt. Як тільки дані будуть очищені, отримані дані далі можна використовувати для подальшого збирання та аналізу даних.

У залежності від обсягу робіт, що виконуються співробітниками ПЛР-лабораторії, необхідно періодично (не рідше одного разу на квартал) проводити внутрішньолабораторний контроль якості дезінфекції, дослідження змивів з робочих поверхонь і повітряного середовища боксів, а також внутрішньолабораторний контроль якості ПЛР-досліджень. Такий контроль здійснюють шляхом дослідження шифрованих атестованих (тобто охарактеризованих не тільки за допомогою ПЛР, але й іншими методами діагностики даної інфекції) контрольних панелей, що містять позитивні та негативні проби, кількість яких повинна бути достатньою для оцінки роботи співробітників і виявлення контамінованих приміщень ПЛР-лабораторії. Крім того, бажано періодично проводити оцінку чутливості діагностичних наборів на основі ПЛР, які використовуються при проведенні досліджень.

8. Методи гібридизації

Метод гібридизації in situ

Суть методу гібридизації *in situ* полягає в кількісному виявленні ДНК (РНК) збудників у гістологічних або цитологічних препаратах внаслідок взаємодії комплементарних нуклеотидних послідовностей з денатурованими (розплетеними) нитками ДНК, що супроводжується утворенням кольорового комплексу, придатного для візуального обліку при світловій або флуоресцентній мікроскопії.

При дослідженні методом гібридизації *in situ* необхідні наступні засоби та допоміжні пристрої:

- мікроцентрифуга для пластикових пробірок зі швидкістю обертання ротору (1–14) тис. об/хв згідно з чинними нормативними документами;
- мікротом санний згідно з чинними нормативними документами;
- витяжна шафа лабораторна згідно з чинними нормативними документами;
- бактерицидна лампа згідно з чинними нормативними документами;
- термостат сухоповітряний, що забезпечує температуру $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ згідно з чинними нормативними документами;
- бокс ламінарний згідно з чинними нормативними документами;
- мішалка магнітна згідно з чинними нормативними документами;
- інкубаторій побутовий на 30–50 ембріонів згідно з чинними нормативними документами;
- автоклав згідно з чинними нормативними документами;
- холодильник побутовий, що забезпечує температуру до мінус $(20\pm 1)^\circ\text{C}$ згідно з ДСТУ 2295;
- вортекс (мікроцентрифуга-струшувач) для перемішування вмісту мікропробірок згідно з чинними нормативними документами;
- термостат для пластикових пробірок об'ємом 0,5 та 1,5 см³, що забезпечує температуру (від 0 °С до 120 °С) згідно з чинними нормативними документами;
- блотер для гібридизації згідно з чинними нормативними документами;
- фотокамера згідно з чинними нормативними документами;
- піч мікрохвильова згідно з чинними нормативними документами;
- ваги лабораторні згідно з ГОСТ 24104;
- мікроскоп світловий згідно з ГОСТ 29214;
- дозатори піпеткові з регульованим об'ємом дози ДПОП-0,5-1-100-1000 мкл згідно з ГОСТ 28311;
- штативи для пластикових пробірок згідно з чинними нормативними документами;
- штативи для скляних пробірок згідно з чинними нормативними документами;
- штативи для автоматичних піпеток (дозаторів) згідно з чинними нормативними документами;
- штативи для наконечників для автоматичних піпеток (дозаторів) згідно з чинними нормативними документами;
- посуд лабораторний скляний згідно з ГОСТ 1770, ГОСТ 12738, ГОСТ 25336;

- посуд пластиковий згідно з чинними нормативними документами;
- пінцети медичні згідно з ГОСТ 21241;
- скальпелі згідно з чинними нормативними документами;
- вата медична гігроскопічна згідно з ГОСТ 5556;
- марля побутова бавовняна згідно з ГОСТ 11109;
- одноразові гумові рукавички хірургічні згідно з ГОСТ 3;
- халати згідно з ГОСТ 24760 та ГОСТ 25194;
- убори головні медичні згідно з ГОСТ 23134;
- контейнери для транспортування клінічного матеріалу згідно з чинними нормативними документами;
- контейнери для дезінфікуючих розчинів з дезінфікуючим хлоровміщуючим розчином згідно з чинними нормативними документами;
- вода дистильована згідно з ГОСТ 6709;
- натрію гідроксид згідно з ГОСТ 4328;
- натрій лимоннокислий згідно з ГОСТ 22280;
- стекла предметні згідно з ГОСТ 9284;
- скельця накривні згідно з ГОСТ 6672;
- шприци типу Люер згідно з ГОСТ 22967 та голки до них згідно з ГОСТ 25377;
- формалін згідно з ГОСТ 1625;
- ксилол згідно з чинними нормативними документами;
- ацетон згідно з ГОСТ 2603;
- бальзам ялицевий для заливання згідно з чинними нормативними документами;
- полістирол згідно з ГОСТ 20282;
- натрію хлорид згідно з ГОСТ 4233;
- кислота сірчана згідно з ГОСТ 4204;
- кислота соляна згідно з ГОСТ 3118;
- калій марганцевокислий згідно з ГОСТ 20490;
- хлорамін Б згідно з чинними нормативними документами;
- спирт етиловий ректифікований згідно з ДСТУ 4221;
- бензол згідно з ГОСТ 5955;
- парафін згідно з ДСТУ 4153;
- трипсин згідно з чинними нормативними документами;
- гематоксилін згідно з чинними нормативними документами;
- еозин згідно з чинними нормативними документами;
- наконечники з аерозольним фільтром для автоматичних піпеток (дозаторів) згідно з чинними нормативними документами;
- гібридаційні зонди згідно з чинними нормативними документами;
- трис-СІ згідно з чинними нормативними документами;
- метанол згідно з ДСТУ 3057;
- гліцерин згідно з ГОСТ 6259;
- гематоксилін Карацці згідно з чинними нормативними документами;
- фарба Романовського-Гімза згідно з чинними нормативними документами;

- SSD-буфер (натрій-натрій цитратний буфер), 20-разовий згідно з чинними нормативними документами;
- трис-ЕДТА-буфер (рН 8,0) згідно з чинними нормативними документами;
- трис-Na-ЕДТА-буфер (рН 8,0) згідно з чинними нормативними документами;
- ангідрид оцтовий згідно з чинними нормативними документами;
- гліцин згідно з чинними нормативними документами;
- протеїназа К згідно з чинними нормативними документами;
- формахід кристалічний згідно з чинними нормативними документами;
- розчин Денхардта згідно з чинними нормативними документами;
- декстрансульфат згідно з чинними нормативними документами;
- дітіотриетол згідно з чинними нормативними документами;
- тритон X-100 згідно з чинними нормативними документами;
- сироватка крові ВРХ згідно з чинними нормативними документами;
- X-фосфат згідно з чинними нормативними документами;
- диметилформахід згідно з чинними нормативними документами;
- левамизол згідно з чинними нормативними документами;
- склоприймальники скляні згідно з чинними нормативними документами;
- шейкер згідно з чинними нормативними документами;
- кювети пластикові згідно з чинними нормативними документами;
- твін-20 згідно з чинними нормативними документами;
- вода деіонізована згідно з чинними нормативними документами.

Для гібридизації *in situ* застосовують гістологічні та цитологічні препарати. З метою виготовлення гістологічних препаратів від загиблих або вбитих тварин відбирають зразки органів розміром не більше (1x2x2) см, в яких локалізується збудник захворювання, котрий є об'єктом дослідження; фіксують у 10 % розчині нейтрального формаліну в щільно закритих ємностях і транспортують до лабораторії в спеціальних опечатаних контейнерах. Тривалість транспортування повинна не перевищувати 2 діб.

Для виготовлення цитологічних препаратів відбирають зразки крові від клінічно хворих тварин або змиви зі слизових оболонок, з яких готують мазки на предметних стеклах, або використовують уражену вірусом культуру клітин з ознаками ЦПД. Стекла з біологічним матеріалом висушують на повітрі та фіксують метанолом з розрахунку 4 см³ на кожне скло і транспортують до лабораторії у спеціальних опечатаних контейнерах.

Відібрані проби клінічного матеріалу в спеціальному опечатаному контейнері направляють до лабораторії з супровідним листом. Оформлення супровідного листа здійснюється згідно з «Правилами відбору матеріалу, крові, кормів, води та пересилання їх для лабораторного дослідження», затвердженими наказом Голови Державного департаменту ветеринарної медицини України № 15-14/111 від 15 квітня 1997 р., при цьому вказують відомості про час забою або загибелі тварини, вік, породу, особливості перебігу захворювання та епізоотичну ситуацію в господарствах і місцевостях.

При дослідженні клінічних зразків і цитологічних препаратів за допомогою гібридизації *in situ* гістологічні попередньо фіксовані препарати зневоднюють шляхом витримки в розчинах етилового спирту з концентрацією

від 60 % до 100 %. Шматочки тканини підсушують на повітрі, після чого заливають у парафінові блоки. З препаратів виготовляють парафінові серійні зрізи, половину з яких обробляють гібридизаційними зондами, а частину яких фарбують гематоксиліном та еозином, після чого досліджують за допомогою методу мікроскопії в порівняльному аспекті.

Цитологічні препарати, мазки крові та мазки зі слизових оболонок також паралельно обробляють гібридизаційними зондами та фарбують гематоксиліном Карацці або за Романовським-Гімза.

Зонди для гібридизації виробляються на основі праймерів або інших специфічно комплементарних до геному збудника олігонуклеотидів. Синтезовані та стандартизовані до концентрації 100 ммоль/мкл олігонуклеотиди в умовах лабораторії ДНК-синтезу мітять флуоресцентними, біотиновими або DIG-мітками.

Розведені до стану сток-розчинів зонди зберігають за температури мінус $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ у темному місці від 3 до 6 місяців.

Забороняється багаторазове заморожування з наступним відтаванням внаслідок руйнування зв'язків олігонуклеотид-мітка та втрати активності зондів.

Приготування розчинів для відмивки препаратів, фіксуючого, передгібридизаційного та гібридизаційного буферів.

Для приготування трис-буферу: змішують 10 см³ 0,1 М розчину Трис-Cl з 30 см³ 1,5 М розчином натрію хлориду та доводять до 100 см³ дистильованою водою.

Для приготування 37 % розчину параформальдегіду: змішують 37 г параформальдегіду – порошку з водою дистильованою, доводячи об'єм до 100 см³. З метою створення основної рН отриманого розчину до нього додають 1 н. розчин гідроксиду натрію з розрахунку 14 мкл/см³. Розчин готується безпосередньо перед використанням.

Для приготування 1 М розчину триетаноламін-трис-буфера змішують 6,66 см³ триетаноламіну 1 М з 1 см³ 0,1 М трис-Cl (рН 8.0) та 43,34 см³ води дистильованої.

Для приготування розчину протеїнази К на трис-ЕДТА-буфері до 1 см³ трис-ЕДТА-буфера безпосередньо перед використанням додають 1 мкл розчину протеїнази К з концентрацією 10 мкг/см³.

Для приготування передгібридизаційного буфера з 20-кратного розчину SSC-буфера готують робочий розчин шляхом розведення його дистильованою водою 1:5. Змішують 4 см³ робочого розчину SSD-буфера з 10 см³ 50 %-ого розчину формаміду в деіонізованій воді та 6 см³ деіонізованої води.

Для приготування гібридизаційного буфера готують 40 % розчин формаміду шляхом розчинення 4 г в деіонізованій воді до 10 см³; 10 % розчин декстрансульфату шляхом розведення 50 %-ого сток-розчину в дистильованій воді 1:4; розчин Денхардта – з 50-разового готують одноразовий розчин. З метою отримання гібридизаційного буфера з розрахунку на 1 см³ змішують 400 мкл розчину формаміду, 200 мкл 10 %-ого розчину декстрансульфату, 20 мкл одноразового розчину Денхардта, 200 мкл робочого розчину SSC-буфера, 10 мкл 10 мМ розчину дітіотриетолу та воду до 1 см³.

Для приготування розчину для імунодетекції 1 змішують трис-СІ (0,1 М, 10,0 см³) з натрію хлоридом (150 мМ, 10 см³) та доводять до 100 см³ дистильованою водою. рН розчину доводять до показника (7,5±0,1). Розчин для імунодетекції 2 готують шляхом змішування 10 см³ трис-СІ (100 мМ), 2 см³ натрію хлориду (100 мМ), 5 см³ магнію хлориду (50 мМ) та доводять до 100 см³ дистильованою водою. рН розчину повинна складати (9,5±0,1). Як розчин для імунодетекції 3 використовують трис-ЕДТА-буфер.

Приготування блокуючого розчину для імунодетекції готують шляхом змішування 87 см³ розчину 1 з 1 см³ 0,1 %-ого розчину тритону Х-100 та 2 см³ 2 %-ого розчину сироватки крові ВРХ.

Розчин для імунодетекції 4 (використовується для пригнічення активності фосфатаз ендogenousного походження), або розчин для імунодетекції 4 готують шляхом змішування 2 см³ розчину для імунодетекції 2,7 мкл Х-фосфатного розчину та 2 мкл розчину левамізолу (0,24 мг/см³).

Х-фосфатний розчин для імунодетекції готують шляхом змішування 50 мкл розчину Х-фосфату (50 мг/см³) з 1 см³ диметилформаміду.

Трис-гліцериний буфер готують шляхом змішування 1 см³ трис-СІ (0,1 М, рН 8,0) з 9 см³ гліцерину.

Підготовлені препарати розміщують у склоприймачі та заливають розчином трис-буферу, який має покривати весь препарат, інкубують за температури (20±5) °С впродовж 5 хв, після чого розчин трис-буферу змінюють на свіжий та витримують ще впродовж 5 хв.

Після видалення трис-буферу додають трис-буфер з додаванням 0,3 % за об'ємом твін-20 та інкубують за температури (20±5) °С ще 15 хв, після чого додають трис-буфер без твін-20 та лишають ще на 5 хв.

Стекла виймають зі склоприймача, на кожен препарат наносять від 100 мкл до 200 мкл розчину протеїнази К на трис-ЕДТА-буфері, переносять у блотер на 5 хв, розігрітий до (37±1) °С, після чого досушують фільтрувальним папером.

На кожне скло наносять від 100 мкл до 200 мкл розчину параформальдегіду (4 %) та трис-буфері та інкубують впродовж 10 хв за температури (20±5) °С.

Стекла з препаратами розміщують у склоприймачі та дворазово відмивають трис-буфером з гліцином (0,75 %) за температури (20±5) °С впродовж 5 хв.

Препарати відмивають на шейкері за температури (20±5) °С впродовж 5 хв трис-буфером з оцтовим ангідридом (0,25 % за об'ємом), дворазово. При цьому препарати розміщують горизонтально в пластикових кюветах.

Після закінчення обробки препарати досушують фільтрувальним папером і наносять на їх поверхню від 100 мкл до 200 мкл передгібридаційного буфера, після чого розміщують на 10 хв у блотері, розігрітому до температури 37 °С.

Для гібридації оброблені передгібридаційним буфером препарати виймають з блотера, видаляють буфер та наносять на поверхню досліджуваних об'єктів суміш, яка містить 30 мкл гібридаційного буфера з 3–10 нг/мкл зонду.

Препарати накривають силіконізованим склом, яке накривають фільтрувальним папером, зволженим 4-разовим SSC-буфером і поміщають у блотер за температури 42 °С. Інкубація здійснюється впродовж від 10 хв до 20 хв, у залежності від методики, що використовується.

Процес відмивання препаратів проводиться в хімічних стаканах об'ємом 50 см³. При цьому препарати два рази відмивають 4-разовим SSC-буфером у стаканах за температури (20±5) °С та два рази при шейкерному струшуванні за температури (20±5) °С. Час відмивання становить від 10 хв до 20 хв при стаціонарному відмиванні та від 10 хв до 20 хв при відмиванні на шейкері.

У випадку підготовки зразків для флуоресцентної детекції прямим методом (за міткою на зондах) зразки висушують та застосовують для мікроскопічного дослідження.

Імунодетекцію застосовують при використанні зондів, мічених неконтрастованими гаптенами. З метою проведення аналізу, відмиті після гібридизації препарати дворазово інкубують за температури (20±5) °С з розчином для імунодетекції 1 у стаканах чи склоприймачах, упродовж 10 хв. На кожне скло наносять від 100 мкл до 200 мкл блокуючого розчину та інкубують у вологій камері впродовж 30 хв. Залишки блокуючого розчину видаляють за допомогою фільтрувального паперу. На кожен препарат наносять від 100 мкл до 200 мкл трис-буферу з твін-20 та 10 мкл препарату специфічних антитіл до мітки зонда (анти-DIG, -FLU або -TSA), та інкубують за температури (20±5) °С впродовж 2 год.

Після інкубації з антитілами препарати відмивають розчинами для імунодетекції 1 та 2 за температури (20±5) °С впродовж 10 хв.

При необхідності дофарбування препарату після відмивки на кожне скло наносять по 200 мкл розчину для імунодетекції 4 (фарбуючий розчин). Стекла лишають у вологій камері на (2–24) год за температури 37 °С в умовах блотеру. Після закінчення терміну обробки реакцію зупиняють трис-ЕДТА буфером і відмивають стекла деіонізованою водою.

Після відмивання та висушування на препарати наносять трис-гліцеринову суміш, вкривають накривним скельцем, висушують та обводять за периметром ялицевим бальзамом.

Препарати, отримані за допомогою методу гібридизації оцінюють шляхом світлової або люмінесцентної мікроскопії, виявляючи, при наявності патогену в аналізованих зразках, кольорове або флуоресціююче забарвлення клітинних і міжклітинних структур препарату.

Перегляд препаратів здійснюють під імерсійною системою мікроскопу, порівнюючи дані гістологічного дослідження з даними гібридизаційного забарвлення.

У разі виявлення деструктивних або дистрофічних змін у гістопрепаратах ці локуси зрізу паралельно оцінюють на препараті з гібридизованими зондами. У разі наявності там збудника, що міг їх зумовити, відмічають наявність специфічного забарвлення при використанні DIG-міток. Це забарвлення має коричневий колір на блакитному тлі, а в разі застосування флуоресцентних зондів уражені елементи зрізу тканини чи органа матимуть різні кольори

флуоресцентного забарвлення (сині, жовті, зелені або червоні залежно від виду мітки).

При дослідженні цитологічних препаратів знаходять локуси ураження моношару, потім оцінюють їх природу шляхом виявлення забарвлених осередків локалізації вірусів чи бактерій в них.

Мазки крові та секретів оцінюють здебільшого методами флуоресцентної гібридизації, підтверджуючи наявність патогенів за присутності зон флуоресценції.

На етапі перегляду пофарбованих препаратів в якості позитивного контролю використовують архівні або референтні зразки, пофарбовані за технологією що використовується, які містять збудника або збудників захворювань, котрі є предметом дослідження. У якості негативних зразків застосовують інтактні референтні матеріали.

Отримані результати оформляють у вигляді протоколу згідно з чинними нормативними документами.

Флуоресцентна гібридизація *in situ* (англ. Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) — це цитогенетичний метод, який використовується для визначення і локалізації певної послідовності ДНК на хромосомі. Для досягнення цієї мети використовуються спеціальні гібридизаційні ДНК-зонди з флуоресцентними властивостями та комплементарні до певної ділянки ДНК. Використання FISH дозволяє визначати різноманітні хромосомні аномалії: делеції, транслокації, ампліфікації, тощо.

Для виконання FISH застосовують ДНК та РНК зонди, для візуалізації відповідно послідовностей в ДНК або РНК. Часто зонди синтезують з ізольованих фрагментів ДНК.

Метод ДНК-чипів.

ДНК-біочип, або ДНК-мікрочип (англ. DNA microarray, DNA chip або gene chip) - це узагальнююча назва технології, яка передбачає використання невеликого за розмірами твердого носія для ідентифікування молекул ДНК та РНК, проведення одночасно множинного кількісного аналізу експресії генів. ДНК-біочипи також інколи називають мікроарейми. Ідея створення біочипів виникла на основі застосування Саузерн-блоту, де специфічна послідовність ДНК, яка є ковалентно закріпленою до субстрату (матриці), гібридизується із досліджуваною, привнесеною послідовністю ДНК. Вперше застосування ДНК-біочипу було описано в статті U. Maskos та E.M. Southern. Біочип не містить традиційних для мікросхем напівпровідників, має вигляд скляного чи полімерного слайду із вибірково закріпленими молекулами ДНК. Матеріал, з якого зроблений носій, технологія нанесення біологічних молекул, їх вид, а також способи їх детекції можуть сильно варіювати. Але спільним залишається принцип мікроскопічного щільного нанесення і одночасного тестування цих молекул. ДНК-мікрочипи зазвичай використовуються для одночасного аналізу рівнів експресії тисяч генів одночасно або для порівняльної гібридизації геномів. Окрім аналізу ДНК,

біочипи можуть бути застосовані для тестування різноманітних біомолекул, наприклад білків. Але, загалом, технологія застосовується для тестування ДНК.

Саузерн-блот (англ. Southern blot) — метод молекулярної біології, що зазвичай використовується для встановлення, чи певна нуклеотидна послідовність присутня в зразку ДНК за допомогою зондів.

Саузерн-блот комбінує агарозний гелевий електрофорез, що використовується для розділення фрагментів ДНК за розміром, з методами переносу розділеної за розміром ДНК на мембрану і гібридизації. Метод названий на честь його винахідника, британського біолога Едвіна Саузерна. Інші методи блоту (тобто вестерн-блот, нозерн-блот та саузвестерн-блот) використовують подібний принцип, але для визначення кількісного складу певної послідовності РНК або білків, та були названі пізніше за аналогією із Саузерн-блотом (від англ. southern, nothern, western — «південний», «північний», «західний»). Оскільки тільки Саузерн-блот названий за власним іменем, ця назва повинна писатися з великої букви, але не назви нозерн-чи вестерн-блотів.

Норсвестерн-блот — це експериментальна техніка в молекулярній біології, що певною мірою є комбінацією вестерн-блоту та нозерн-блоту; в результаті норсвестерн-блот експерименту можливо виявити взаємодії між РНК та білками. Споріднена техніка, вестерн-блот, використовується для детекції окремих білків у складних сумішах за допомогою розділення геле-електрофорезом, переносом продуктів розділення на нітроцелюлозну мембрану та обробку мембрани антитілом та специфічним барвником для детекції. Інша споріднена техніка, нозерн-блот, використовується для детекції РНК; при цьому комплементарні гібридизаційні олігонуклеотиди-зонди використовуються замість антитіл для обробки мембрани з продуктами електрофоретичного розділення. Норсвестерн-блот поєднує в собі елементи вестерн-блоту та нозерн-блоту, що дозволяє специфічно детектувати РНК-білкові взаємодії.

Першим етапом норсвестерн-блоту є розділення РНК-зв'язуючих білків за допомогою електрофорезу. Після цього розділені відповідно до заряду та молекулярної маси білки переносяться на нітроцелюлозну мембрану.

Далі, мембрана обробляється протеїн-вмісним блокуючим розчином, щоб уникнути неспецифічного зв'язування антитіл з мембраною.

Після блокування, розчин певної конкурентної міченої РНК додається до мембрани та інкубується, що призводить до зв'язування РНК із відповідними РНК-зв'язуючими білками, якщо вони присутні на мембрані. Час інкубації залежить від концентрацій РНК та білку та константи дисоціації комплексу; типовий час інкубації складає приблизно одну годину. Після цього надлишок РНК відмивається (фосфатний буфер), а потім радіоактивна РНК, що зв'язалась з РНК-зв'язуючими білками, детектується за допомогою ауторадіографії.

Метод норсвестерн-блоту дає змогу швидко визначити наявність, молекулярну масу та відносну кількість РНК-зв'язуючих білків. Техніка може бути поєднаний з вестерн-блотом, щоб отримати додаткову інформацію щодо ідентичності окремих білків.

Перевагою нортвестерн-блоту є можливість відносно швидко визначити кількість білків, які зв'язуються з певною послідовністю РНК. Він як правило є першим кроком в аналізі РНК-білкових взаємодій та дає первинну інформацію, яка необхідна для подальшого вивчення конкретних білків.

Недоліком методу є те, що певні РНК-білкові комплекси з малою константою асоціації не можуть бути ідентифіковані. Використання неоптимальних умов проведення окремих стадій призводить до низького відношення сигнал/шум, що також ускладнює інтерпретацію результатів. Окрім цього, необоротна денатурація білків також може призводити до неможливості ідентифікації їх РНК-зв'язуючих властивостей. Неможливим також є вивчення РНК-білкових комплексів, що включають декілька білкових субодиниць.

9. Рестрикційно-ензимний аналіз

Рестрикційно-ензимний аналіз ампліфікованої ДНК — це молекулярно-генетичний метод, що базується на накопиченні специфічного продукту за допомогою ПЛР і використанні рестриктаз з метою його перетравлення на декілька фрагментів шляхом розрізання (рестрикції) за окремими локусами. Рестрикційно-ензимний аналіз використовують для геномного фінгерпринтингу, що необхідно для ідентифікації мікроорганізмів.

Для РЕА розробляють універсальні праймери, за допомогою яких ампліфікують послідовності бактеріальної або вірусної ДНК (кДНК) з наступним перетравленням рестрикційними ендонуклеазами, що супроводжується утворенням більш дрібних ДНК-фрагментів. Аналіз цих рестрикційних фрагментів використовується для визначення поліморфізму та класифікації бактеріальних або вірусних ізолятів до роду та виду. Їх розділяють в гелі та досліджують за допомогою спеціальних комп'ютерних програм для аналізу гелів.

Одним із варіантів РЕА є аналіз поліморфізму довжини термінальних рестрикційних фрагментів, створений на основі спостереження того, що довжина термінальних рестрикційних фрагментів ампліфікованого гена 16S рРНК специфічна для різних філогенетичних груп. Після інкубації з рестриктазами ампліфікованих 16S фрагментів 5'-праймер, зв'язаний з міченим флуоресцентним барвником, мітить термінальний фрагмент ДНК, який тепер специфічно виявляється, і розміри якого визначають до кількох пар нуклеотидних залишків, використовуючи метод горизонтального або вертикального електрофорезу.

10. Роль і практичне застосування молекулярної діагностики у медицині та біології

Сучасний етап розвитку людського суспільства, глобалізація, війни та суспільно-політичні конфлікти, розвиток сільськогосподарського виробництва продукції тваринництва та рослинництва, супроводжується постійним зростанням біологічних ризиків, призводить до зміни нозоареалів збудників інфекційних хвороб людини та тварин, векторів, відповідальних за їх перенесення, емерджентції та реемержентції інфекцій, що потребує невідкладного підвищення вимог до організації епідеміологічного та епізоотологічного нагляду, особливо в питаннях моніторингу, прогнозування та діагностики інфекційних хвороб в суспільстві, сільському господарстві та дикій природі.

Нові тести з виявлення та типування патогенів, що пропонуються до застосування у практиці гуманної та ветеринарної медицини, завжди потребують ретельної систематизації та визначення їх місця в існуючій системі.

Найбільший ажіотаж сьогодні створюється навколо методів молекулярної діагностики. З-поміж їх числа рутинними вже стали ПЛР у різних модифікаціях, методи гібридизації зі специфічними зондами та навіть метод секвенування набуває дедалі більшої доступності серед ветеринарної спільноти світу.

Непрямим свідченням ефективності та доцільності застосування молекулярно-генетичних тестів є невідкладно зростаючі обсяги їх впровадження у світі. Лише за останні 10 років вкладення у їх розвиток виростили з 300 млн доларів США до 8 млрд, що пов'язано з поширенням хвороби Ебола, Зіка, атипової пневмонії, COVID-19-інфекції та інших хвороб [EMBO, 2006–2020, WHO, 2020–2022].

Яке ж місце повинна зайняти сьогодні ПЛР у практиці медичної та ветеринарної лабораторної діагностики? Оскільки реакція є методом прямого виявлення збудника, її можна непрямим чином зіставити з методами індикації антигену збудника чи його безпосереднього ізолювання.

Якщо говорити про порівняння класичних мікробіологічних тестів з ПЛР, остання поступається культуральному методу. Це, перш за все, пояснюється природою бактерійних патогенів. Збудники бактерійної природи є прокаріотичними організмами зі складною геномною організацією, що виключає інфекційність їх геномного матеріалу в разі нежиттєздатності збудника. Описана обставина нівелює цінність ПЛР, як діагностичного тесту при бактеріальних інфекціях. Єдиним послабленням у цьому є застосування так званого іРНК-скринінгу, що передбачає виявлення життєздатних форм за наявності такого важливого елементу їх репродукції, як інформаційна РНК. кДНК-копії з її матриць можна детектувати за ПЛР на фоні попереднього руйнування в екстрактах ДНК відповідними ензимами, вільними від РНКаз. Живі форми мікроорганізмів продукують іРНК, а виявлення її є свідченням життєздатності збудника. Цей тест досить давно описаний в літературі, однак внаслідок трудомісткості та довгої тривалості не користується популярністю ні серед дослідників, ані в практиці.

Є сенс охарактеризувати ПЛР, як доцільний тест при скринінгових дослідженнях матеріалів, що вміщують ймовірних збудників бактерійної природи в об'єктах довкілля (сибірка, лептоспіри за МЕБ, 2008–2020) та об'єктах післязабійної експертизи (бруцельоз, лістеріоз, сальмонельоз, шигатоксигенні кишкові палички за МЕБ, 2008–2020). У випадку дослідження діагностичних матеріалів, чия інфекційність не доведена за класичними методами, позитивний результат є приводом для занепокоєння та загострення моніторингових заходів, а не може інтерпретуватись як «діагноз».

У цьому контексті слід віднести до окремої групи об'єктів нагляду генетичні ресурси. Їх контролювання потребує системного підходу. Зокрема, на етапі відбору та перед консервацією сперми, яйцеклітин та ембріонів тварини мають бути досліджені за рекомендованими методами, а продукти можуть бути скринінгово обстежені за допомогою ПЛР з виявлення таких чинників, як бруцели та хламідії, що передаються з цими матеріалами. У разі виявлення ДНК згаданих патогенів ефективність тестувань має бути доведена класичними методами, проте на весь час дослідження згадані матеріали повинні проходити «карантинування», що виключає торгіві, імпортно-експортні та транспортні операції по відношенню до цих генетичних ресурсів (ОІЕ, 2004, 2008, 2009, 2012).

Місце ПЛР та інших діагностичних методів молекулярної генетики в системі контролю бактерійних хвороб може бути також визначене, як неодмінна складова в системі ідентифікації та типування патогенів після ізолювання та охарактеризування за мікробіологічними техніками. Серед захворювань, що контролюються МЕБ така ситуація описана по відношенню до збудників сибірки, хламідій, мікоплазм, лептоспір, мікобактерій, пастерел та інших інфекційних агентів (ОІЕ, 2012). Окрім того, ПЛР є важливим інструментом для індикації та ідентифікації складно культивованих або нових захворювань, до яких інші методи виявлення збудника ще не створені.

Інша ситуація існує по відношенню до вірусних інфекцій. Вірусні патогени є носіями генетичного матеріалу, який має інфекційні властивості, що пояснює діагностичну цінність факту детектування геному в біоматеріалах. Це твердження не виключає сприйняття «золотих стандартів» діагностики вірозів тварин, тобто ізолювання в культурах клітин, ембріонах курей та серологічної ідентифікації в реакціях нейтралізації, імунофлуоресценції тощо, але значно розширює повноваження та ефективність групи методів молекулярної діагностики та молекулярної епізоотології.

Сьогодні документально роль ПЛР, як тесту, рекомендованого для постановки діагнозу, відведено Всесвітньою організацією охорони здоров'я при діагностиці COVID-19-інфекції та ряду інших особливо небезпечних вірусних хвороб людей, а також Міжнародним Епізоотичним Бюро при блутангу, інфекційному ринотрахеїті ВРХ та африканській чумі (виснаженні) коней, а також альтернативним у системі діагностики лейкозу ВРХ (Кодекс МЕБ, 2011).

Аналізуючи відношення ВООЗ та МЕБ до вірусних інфекцій, що сьогодні контролюються в Україні, ПЛР введено до переліку діагностичних тестів Мануалу майже при всіх хворобах.

У практиці гуманної медицини ПЛР застосовуються при діагностиці комплексів урогенітальних інфекцій, ВІЛ-СНІД, виявленні полірезистентних форм збудників туберкульозу. ПЛР розробляється для виявлення майже усіх збудників інфекційних та цілого ряду паразитарних хвороб людини.

Аналіз існуючих створених та узаконених МЕБ протоколів показує, що місце ПЛР, як діагностичного тесту описане при везикулярних хворобах тварин, сказі, блютангу, хворобі Ауескі, високопатогенному грипі, ньюкаслській хворобі, хворобі Гамборо, інфекційному бронхіті курей, інфекційному ларинготрахеїті, інфекційному ринотрахеїті ВРХ, вірусній діареї ВРХ, класичній та африканській чумі свиней, трансмісивному гастроентериті свиней та інших.

При хворобі Ауескі описане застосування ПЛР в якості швидкого та доволі надійного тесту з виявлення вірусоносіїв. Охарактеризовано важливість реакції в системі дослідження матеріалів, що піддалися розкладанню чи бактерійній контамінації, внаслідок чого виключається можливість застосування вірусологічних тестів. Важливою характеристикою ПЛР при скринінгу вірусоносійства є можливість використання її, як дискримінуючого тесту при впровадженні вірусвакцин, що містять марковані штами збудника. Саме така методика розроблена та валідована нами по відношенню до вірусу хвороби Ауескі, що базується на застосуванні специфічних праймерів до гена gE. За чутливістю вказаний тест у кілька десятків разів переважає існуючі методики з виявлення вірусних антигенів та ізолювання збудника.

Блютанг є однією з небагатьох хвороб вірусної етіології, для контролю якої ПЛР є рекомендованим МЕБ тестом. Це стосується в першу чергу тварин і матеріалів тваринного походження, що виступають об'єктами міжнародної торгівлі. У доступній літературі також є відомості про ефективне застосування тесту з метою типування збудника за серотиповою належністю. При цьому більшість вчених визнає пріоритетну роль протоколів на основі класичної ПЛР, віддаючи їм перевагу в порівнянні до ПЛР у реальному часі, саме протоколи для ПЛР у гель-варіанті зведені в Мануалах з діагностичних тестів МЕБ (5-те та 6-те вид.).

Іншим захворюванням, у системі лабораторної діагностики якого ПЛР також займає місце тесту першої групи пріоритету, є інфекційний ринотрахеїт ВРХ. Цінність ПЛР, як діагностичного тесту проявляється в здатності до більш ефективного виявлення вірусу при застосуванні вірусологічних методик; у можливості досліджувати непридатні до вірусологічних експертиз матеріали, що є в наявності у малій кількості або піддалися розкладанню, а також при дослідженнях у сфері ветеринарного нагляду, особливо об'єктів міжнародних торговельних взаємовідносин – наприклад, генетичних ресурсів ВРХ. Крім того, вже за допомогою ПЛР можна провести більш глибокі дослідження з типування збудника. При цьому є діагностичні протоколи, здатні диференціювати лінії вірусу на серотипи (1, 4, 5) та субтипи (1,1; 1,2), надаючи більше можливостей для виваженої та цілеспрямованої організації оздоровчих і превентивних заходів у зоні поширення інфекції.

ПЛР надає особливих можливостей в контексті наукових досліджень РНК-вміщуючих вірусів, зокрема таких, як збудники SARS-CoVi2 інфекції, грипу, у

ветеринарній медицині - ньюкаслської хвороби, високопатогенного грипу птиці, діареї ВРХ, прикордонної хвороби та класичної чуми свиней, сказу та респіраторно-репродуктивного синдрому свиней.

Так, при ньюкаслській хворобі птиці ПЛР застосовують з метою моніторингу вірусоносійства в дикій орнітофауні, індикації та ідентифікації збудника в матеріалах, що надходять для вірусологічних досліджень, а також ідентифікації виділених ізолятів вірусу. ПЛР при ньюкаслській хворобі застосовують також з метою пато- та генотипування вірусу. Для цього генами таргетної детекції є гени протеїну адгезії (F) та нуклеопротеїну (NP). При цьому засоби молекулярно-генетичних досліджень, такі як секвенування та ПДРФ-аналіз, з успіхом можуть замінити трудомісткі та довготривалі, пов'язані з рядом біологічних ризиків, процедури патотипування за біопробою. Вони ж дозволяють встановити генотипові характеристики, що відіграють основну роль у дослідженні шляхів ймовірного заносу інфекції до популяції чутливих до зараження тварин.

При високопатогенному грипі птиці та грипі людини існує дві системи альтернативної діагностики, що взаємно доповнюють одна одну, – вірусологічні та молекулярно-генетичні тестування. Вірусологічні методики при цьому займають провідне місце, але, водночас, вони трудомісткі та потребують багато часу. На їх основі встановлюється офіційний заключний діагноз. З метою прискорення засобів та інструментів механізму реагування при моніторингу та експрес-діагностиці грипу альтернативу їм складають молекулярно-генетичні методології. Вертикаль молекулярної діагностики грипу формується з трьох послідовних ступенів. На першому етапі йде виявлення збудників типу А. У разі наявності на другому проводиться перевірка ймовірної належності циркулюючого вірусу до високопатогенних субтипів H5 та H7, а за показань – і H9. Проби, позитивні за належністю РНК до цих вірусних груп підлягають ще більш поглибленому дослідженню в напрямках секвенування області сайту нарізання гена гемаглютиніну. Ці тестування надають змогу, по-перше, встановити рівень патогенності вірусу за амінокислотною послідовністю його сайту нарізання, а, по-друге, визначити його походження при порівнянні з іншими штамми та ізолятами вірусу. Невід'ємною складовою при молекулярній діагностиці та моніторингу грипу є його диференційна діагностика від ньюкаслської хвороби, що також може бути забезпечена з використанням ПЛР.

Важко переоцінити значення молекулярної діагностики при цілому спектрі інших вірусних хвороб птиці. Зокрема, секвенування є чи не єдиним способом диференціації вакцинних та епізоотичних варіантів вірусів інфекційного бронхіту курей та хвороби Гамборо. ПДРФ-аналіз є основою такої диференціації при інфекційному ларинготрахеїті птиці, ентериті гусей та ряді інших інфекцій.

Повертаючись до вірусних інфекцій жуйних необхідно відзначити важливу роль ПЛР при контролі діареї ВРХ та прикордонної хвороби. Молекулярно-генетичні методи при цих інфекціях виконують роль скринінгових тестів з ідентифікації збудника, а також, зважаючи на значне генетичне розмаїття популяцій вірусів, – з їх генотипування.

Стосовно таких дискусійних і важливих на сьогодні захворювань, як африканська та класична чума свиней сприйняття молекулярно-генетичних прийомів, розроблених для їх скринінгу, у світі є надто неоднозначним. Зокрема, попри існуючі модифікації методу ПЛР в режимі реального часу для детекції вірусу АЧС, лише одна з них набула легалізації згідно з Мануалом МЕБ. До того ж, як нам особисто вдалося пересвідчитись, вона за чутливістю значно поступалася методикам на основі класичної ПЛР. Що стосується класичної чуми свиней, то молекулярна діагностика цього захворювання не обмежується лише засобами детекції вірусу, але й існує потреба в генотипуванні його збудника, що знов таки визначає місце класичної ПЛР, як основного тесту.

Роль ПЛР в системі контролю генетичних ресурсів ВРХ поряд з протоколами детекції ДНК хламідій та ДНК і РНК інших вірусів є важливим інструментом у перериванні епізоотичного ланцюга при конгеніальних вірозах ВРХ та хламідіозі.

ПЛР має визначне місце при діагностиці сказу. Цей тест дозволяє ефективно досліджувати будь-які види матеріалів, у т.ч. такі, що піддалися природній ферментації та розкладанню, в яких вірус локалізований позаклітинно, секретах та екскретах, щільних (кістковій та хрящовій) тканинах. ПЛР також є інструментом для накопичення варіабельних ділянок генів збудника сказу з метою їх секвенування та генотипування вірусу.

В гуманній медицині ПЛР широко застосовують для стринінгу матеріалів для трансплантації, у т.ч. – для гемотрансфузії, препаратів кордової крові, стовбурових клітин, кісткового мозку, інших трансплантатів, а також в системі трансплантації яйцеклітин, ембріонів, за проведення ЕКЗ тощо.

Важливим місцем ПЛР в системі контролю хвороб свиней є дослідження при цирковірусній інфекції. Як показали дослідження, проведені за допомогою розробленого нами діагностикому, відсоток уражених тварин у господарствах нашої держави є досить великим. Це зумовлює необхідність загострення контролю за імпортованими тваринами та їх продукцією, адже вони є джерелом потрапляння та поширення вірусу територією України.

Важливим практичним аспектом застосування молекулярно-генетичних тестів є системи біотехнологічного контролю. Завдяки значній експресності цих методів вони придатні для скринінгу контамінації мікоплазмами та вірусними агентами сировини для виготовлення імунобіологічних препаратів, контролю готової продукції (особливо критичним є контроль живих вакцин для ВРХ щодо контамінації вірусом діареї та вакцин проти хвороб свиней щодо цирковірусної контамінації). При цьому молекулярно-генетичні тестування дозволяють ефективно досліджувати автентичність розплодок виробничих штамів і досліджувати інші їх паспортні характеристики.

Якщо роль інструментів молекулярної діагностики більш-менш нами описана вище, то ми зовсім не торкнулися питання стосовно визнаних у світі її інструментів. На сьогоднішній день стрімко розвивається ринок пропозицій щодо ПЛР в режимі реального часу. Ця тенденція оцінюється позитивно, адже розробники декларують високу чутливість і специфічність тестувань, більшу у

порівнянні до класичного варіанту експресність і безліч інших переваг. (*а з іншого? – або перефразувати, або дописати*)

Проаналізувавши значний масив наукової та дорадчої літератури з цього питання слід розставити декілька акцентів. Зважаючи на ціну обладнання та собівартість самої реакції можна з упевненістю казати, що традиційна ПЛР ще довго буде мати виграшні позиції у порівнянні до ПЛР в режимі реального часу. Надійність тесту визначається його наявністю у чинних рекомендаціях МЕБ або ВООЗ. При цьому традиційним тестам немає рівних, адже прямі цитування в Мануалі стосовно ПЛР у режимі реального часу є лише при африканській чумі, грипі птиці та інших нечисленних хворобах.

З усіх сфер практичного застосування кількісної ПЛР на увагу заслуговує лише необхідність скринінгу продуктів харчування, сировини тваринного походження та кормів для тварин щодо вмісту генетично модифікованих компонентів, і то тільки тому, що для цих продуктів встановлені припустимі рівні вмісту означених компонентів і їх похідних. Кількісні характеристики детектованих продуктів мають велике значення в наукових дослідженнях з патогенезу та імуногенезу, які в практиці просто непотрібні.

При проведенні наукових досліджень генотипові та патотипові характеристики вірусів тварин встановлюються методами ДНК-аналізу, для яких ПЛР є інструментом напрацювання матеріалу для вивчення. За ПЛР напрацьовуються фрагменти для ПДРФ, секвенування та інших тестів.

Отже, з огляду на зазначене вище, можна стверджувати, що молекулярно-генетичним тестам, особливо ПЛР, на сьогодні належить неабияка роль у системах моніторингу, лабораторної діагностики, біотехнологічного контролю, однак, як і будь-який метод вона потребує кваліфікованого та обґрунтованого застосування. При цьому необхідно перш за все керуватись діючими вимогами та рекомендаціями Міжнародного Епізоотичного Бюро, а у випадках зооантропонозів – Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я. З огляду на інструментальні можливості, потреби у впровадженні та сенс застосовуваних тестів для України є потреба в широкій імплементації методів молекулярної діагностики, яка при використанні у практичних установах має базуватись на традиційній ПЛР, а для забезпечення належного наукового прогресу відповідні наукові центри та установи мають бути забезпечені за підтримки держави засобами детекції в режимі реального часу та ДНК-аналізу (секвенування).

11. Біотехнології рекомбінантних ДНК/РНК. Виготовлення, контроль якості та аспекти біобезпеки при застосуванні імунобіологічних препаратів для біології та медицини

Залучення технологій рекомбінантних ДНК/РНК до процесів виготовлення імунобіологічних препаратів

Створення рекомбінантних конструкцій та засобів генної терапії – це один з найбільш перспективних на сьогодні напрямів біотехнології. Обсяги впровадження та комерціалізації його продукції вражають, досягаючи цифри понад 100 млрд доларів на рік. Відчутним є вплив технологій рекомбінантних ДНК на всі сфери сільського господарства та ветеринарну медицину в тому числі. У гуманній медицині ці процеси ще більш виражені, адже сума від реалізації лише рекомбінантного інсуліну перевищує 30 млрд доларів на рік.

Рекомбінантні продукти, що виробляються для гуманної та ветеринарної медицини можна розподілити на декілька груп:

1. Рекомбінантні антигени (вакцинні та діагностичні).
2. Рекомбінантні біоактивні речовини.
3. Рекомбінантні ДНК-контролі та стандарти.
4. ДНК-вакцини.

Перед тим як оглянути системи, створені на основі технологій рекомбінантних ДНК, необхідно проаналізувати основні поняття, що стосуються цього питання.

По-перше, за типом утворюваних рекомбінантних ДНК (тобто змінених ДНК) живі організми поділяються на інсерційні та делеційні мутанти дикого генотипу організму. Делеційні мутанти характеризуються відсутністю одного чи кількох генів у генотипі мутанта в порівнянні з організмом дикого типу. Інший тип організму-продукту складають інсерційні мутанти, до геному яких відповідний ген долучається штучно. Матеріальною основою корисності рекомбінантного організму при цьому є виключення одного чи кількох негативних ознак (патогенність, низька репродукуюча активність тощо) з одночасним або неоднотимчасним набуттям позитивних ознак (можливість до секреції певних корисних речовин тощо).

Іншим важливим поняттям у технології рекомбінантних ДНК є поняття «система вектор-хазяїн».

Хазяїн (або реципієнт) – це репродукуюча система, яка отримує певні генетичні детермінанти, внаслідок чого змінює свої біологічні властивості в бік синтезу тої чи іншої корисної речовини (завдяки вбудовуванню тих чи інших генів організму-донора) або змінює процеси синтезу речовин власного організму (втрачає можливість секретувати антигени чи фактори патогенності або навпаки нарощує обсяги експресії протеїнів тощо).

Організми-хазяї мають бути досконало вивчені відносно особливостей генотипу, фенотипу, фізіологічних властивостей, патогенності та екології, що при створенні рекомбінантних продуктів на їх основі служить підґрунтям для розробки систем контролювання кінцевих продуктів, визначенні необхідних

параметрів щодо біобезпеки при поводженні з рекомбінантними мікроорганізмами та їх продуктами.

У біотехнологічному виробництві застосовують наступні типи організмів-хазяїв:

- віруси (здебільшого віруси тварин і комах);
- бактерії (здебільшого *E. coli*);
- дріжджі (*Sacc. cerevisiae*);
- культури клітин тварин.

Донор – це організм ген, частина гена або гени якого виступають об'єктом клонування. При клонуванні його генів мають бути досліджені особливості останніх, біологічні властивості всього донорського організму. Ці параметри, при вивченні на належному рівні, дають змогу успішно отримати функціональний клонований продукт.

Вектор – це ДНК-молекула, яка здатна до репродукції в організмі-хазяїні та складається з хазяїноспецифічних ДНК (45–70 % довжини) і вбудованої частини геному донора (30–55 % довжини).

Типи векторів, що застосовують для створення рекомбінантних конструкцій розподіляються на:

- плазміди (касетні заміщуючі плазміди, бактерійні плазміди, дріжджові плазміди);
- фагові ДНК;
- комбіновані плазмідно-фагові вектори;
- вірусні ДНК (покс-, адено-, герпес- та бакуловіруси).

Рекомбінантні антигени та рекомбінантні вакцини є найбільш чисельними групами препаратів, що створюються як для ветеринарної, так і для гуманної медицини на основі генетично-модифікованих організмів.

На сьогодні рекомбінантні антигени для серологічної діагностики лейкозу (IDEXX, ННЦ «ІЕКВМ»-ДіаПрофМед), бруцельозу (PIWet, ННЦ «ІЕКВМ»-ДіаПрофМед), лістеріозу (Merial), грипу птиці, ньюкаслської хвороби, хвороби Гамборо (IZPSVe, VLA, IDEXX, Biocheck), хвороби Ауескі (БТЛ), респіраторно-репродуктивного синдрому свиней (PIWet) та інші набули широкого вжитку в усьому світі, включаючи Україну. Обсяги комерціалізації цих продуктів вражаючі. Лише, наприклад, у Польщі щороку проводиться понад 10 млн аналізів на лейкоз ВРХ за допомогою ІФА.

У гуманній медицині також запропонований цілий спектр рекомбінантних антигенів для діагностики COVID-19 інфекції, грипу типів А, В, С, кору, ВІЛ-інфекції, гепатиту С, лихоманки Західного Нілу, хламідіозів, мікоплазма-інфекцій, поліомієліту, пневмококових інфекцій, трипаносомозу, антитіл до бактерій родів *Helicobacter*, *Neisseria* тощо.

Рекомбінантні вакцини проти сказу (Merial), хвороби Гамборо та Марека (Merial), грипу птиці та інших інфекцій вже активно впроваджуються у ветеринарну практику. Ці препарати пройшли доклінічні та клінічні випробування в Європі, Америці та Азії і мають високий попит на ринку імунобіологічних препаратів. У гуманній медицині запропонований ряд вакцин проти COVID-19-інфекції, грипу людини, поліомієліту, кору, краснухи, простого

герпесу різних типів, ретровірусних інфекцій (зокрема ВІЛ), гепатиту С, цервікальної бластоми тощо.

Іншим типом продуктів, що отримують у результаті генно-інженерних маніпуляцій є делеційні мутанти вірусів і бактерій. У результаті цієї біотехнологічної процедури вдається отримувати збудників зі зміненим генотипом, які є маркованими щодо відсутності окремих генів. На основі подібних генетично модифікованих мікроорганізмів у більшості країн світу базується система диференціації інфікованих і вакцинованих тварин (DIVA-стратегія). У такий спосіб отримані марковані вакцини проти інфекційного ринотрахеїту ВРХ (вакцинний вірус дефектний за глікопротеїном Е), хвороби Ауескі свиней (з геному збудника вилучений той же ген), хвороби Марека (віруси швидкої атенуації отримують шляхом вилучення маркерів патогенності) тощо.

Завдяки такому типу генно-інженерних маніпуляцій отримані мутанти вірусів лихоманки долини Ріфт, простого герпесу людини, збудників сальмонельозу, гепатиту В, аденовірусної інфекції людини та ін.

Наступним типом генно-інженерних продуктів ветеринарного значення є ДНК-вакцини. Це препарати рекомбінантних нуклеїнових кислот, які здатні функціонувати в організмі тварин і людей, продукуючи специфічні антигени та створюючи імунітет проти інфекції. Діючою речовиною цих препаратів є ДНК збудника або комплементарна ДНК-копія РНК збудника, що залучена до молекули-вектора. Ці комплекси є надзвичайно нестійкими, адже можуть руйнуватись ферментами бактерій та секреторними ферментами щеплюваного організму, а отже їх введення до організму може бути здійснено лише через залучення специфічних захисних речовин. Існує кілька типів таких субстратів. Найбільш відомим і широко застосовуваним у практиці методом інкапсуляції ДНК у вакцинах є створення ліпосомальних форм. Внаслідок цього ДНК-молекули вкриваються ліпідним шаром, що стимулює проникнення ДНК до цільових клітин, які відповідають за імунну відповідь при певній інфекції. Такі комплекси можна отримувати з різних ліпідних композицій. Вони мають дешеву вартість та поширені на ринку. Комплекси ДНК-ліпосома, які інакше називають віросомами, мають виражені імуностимулюючі властивості, що сприяє швидкому утворенню надійного імунітету проти захворювання. За принципом віросом запропоновано такі відомі біотехнологічні розробки, як вакцини проти вірусної діареї ВРХ, грипу людини і птиці, блютангу, лейкозу ВРХ для ветеринарної медицини та ВІЛ-СНІДу, герпесвірусної, папілома вірусної, поліомавірусної інфекцій, раку шийки матки, лихоманки долини Ріфт та ін. для гуманної медицини.

Розмаїття форм ДНК-вакцин включає також ДНК-синтетичні комплекси (з білковими або полісахаридними захисними оболонками) або комплекси нуклеїнової кислоти з дорогоцінними металами. Ці розробки більш дорогі, важко стандартизуються та нетехнологічні у плані серійного виготовлення та введення тваринам. За таким принципом створювались вакцини проти грипу людини та птиці, малярії, хвороби Марека та інші. Проте вони не набули широкого впровадження або трансформувались у вакцини ліпосомального типу.

На сьогодні на тлі пандемії нової коронавірусної хвороби SARS-CoVi2 (COVID-19) широкого застосування набули РНК-вакцини.

РНК-вакцина, вакцина на основі рибонуклеїнової кислоти — вакцина, діюча частина якої — рибонуклеїнова кислота (зазвичай матрична, мРНК), що кодує білок, характерний для патогена. Крім власне РНК, у вакцинні присутня ліпідна оболонка, що захищає РНК від руйнування і забезпечує проникнення РНК в клітину.

Коли вакцинна РНК потрапляє до клітини, клітинні механізми синтезу білків продукують закодований в РНК білок. Цей білок діє як антиген: його виявляє імунна система організму і навчається на цьому білку — в організмі формується імунітет. Надалі, при потраплянні в організм патогена, імунна система пізнає його по вже відомому білку і знищує інфекцію, не даючи розвинути захворюванню.

РНК-вакцини можуть бути розроблені проти всіх білкових антигенів, оскільки після вакцинації РНК-вакциною під час трансляції з матриці РНК утворюється білок. Білки можуть походити, наприклад, з вірусів, бактерій або пухлин (пухлинний антиген). Використання РНК-вакцин для імунізації проти вірусних інфекційних захворювань означає, що в організм більше не вводяться репродуктивні патогени або їхні фрагменти, як у випадку мертвих вакцин, а тільки мРНК антигенів з допоміжною речовиною, яка вводить РНК в клітини (реагент для трансфекції). Якщо трансфіковані мРНК клітини тимчасово представляють цей компонент вірусу, з яким необхідно боротися, імунний захист вакцинованої людини вчиться розщеплювати антиген і, в разі реальної інфекції, захищати його від природного патогена. Результат: господар (людина або тварина) набуває імунітет.

Щоб створити мРНК-вакцину проти вірусу, не потрібен сам вірус, досить мати його секвенований і розшифрований геном. Вакцинна мРНК створюється на основі короткої генетичної послідовності з геному вірусу, яка кодує білок вірусу (зазвичай поверхневий, за допомогою якого вірус проникає в клітину). Синтезована мРНК поміщається в ліпідну наночастинку, яка доставляє вакцинну мРНК всередину клітини. Усередині клітини мРНК взаємодіє з генетичним механізмом клітини, і він синтезує закодований в ній вірусний білок. Потім цей білок виходить на поверхню клітини, і імунна система організму починає на нього реагувати, в процесі цієї реакції виробляється імунна відповідь на вірусний білок.

Типи РНК-вакцин

На 2018 рік створено три типи РНК-вакцин, всі на основі матричної РНК:

- мРНК-вакцина, що не реплікується;
- мРНК-вакцина, що самореплікується;
- дендритна клітинна мРНК-вакцина, що не реплікується.

У вакцинах Pfizer-BioNTech (Comirnaty®) та Moderna проти COVID-19 використана інформаційна рибонуклеїнова кислота (іРНК), що викликає імунну реакцію, яка може захистити від зараження у майбутньому.

Традиційні вакцини передбачають введення в організм ослабленого чи інактивованого збудника інфекції. Вакцини на основі інформаційної РНК (іРНК),

наприклад, вакцини проти COVID-19 Pfizer і Moderna, вчать клітини виробляти білок, який запускає імунну реакцію у разі зараження. Після введення вакцини в плече іРНК потрапляє до клітин поблизу місця ін'єкції і спонукає їх почати вироблення того ж білка, який виявлений у збуднику COVID-19. Імунна система розпізнає цей білок і починає виробляти антитіла, які можуть боротися з вірусом у разі подальшого зараження вакцинованої людини.

Жодна з цих вакцин жодним чином не взаємодіє з ДНК і не змінює її і, отже, не може спричинити раку. Інформаційна РНК - це не те саме, що ДНК, тому вона не може об'єднуватися з ДНК і змінювати генетичний код. Інформаційна РНК тендітна - передавши інструкції вашим клітинам, вона руйнується і виводиться з організму (приблизно через 72 години). Інформаційна РНК навіть не потрапляє в ядро клітини - ту частину, де міститься ДНК. Отже, міф про те, що вакцина на основі іРНК може якось блокувати активність генів, що пригнічують ракові пухлини, не відповідає дійсності. Вакцина проти COVID-19 не піддає вам впливу вірусу, що викликає COVID-19.

Ще одним класом речовин, які отримують за рахунок генно-інженерних маніпуляцій, є імуностимулятори та біоактивні речовини рекомбінантного походження. Ці препарати широко вживають у сфері лікування та профілактики інфекційних хвороб тварин. Їх використовують самостійно для коригування імунного статусу, для лікування імунопатій, при вакцинопрофілактиці для активації процесів створення імунітету проти певного захворювання тощо. Рекомбінантні продукти також залучають до створення діагностичних наборів з визначення біоактивних речовин-медіаторів імунітету, таких як інтерлейкіни, інтерферони та ряд гормональних речовин. Ці тести застосовують для визначення імунного статусу тварин і людей. Шляхом молекулярного клонування отримані та активно впроваджуються інтерферони різних видів тварин, інтерлейкін 1, 2, 6, фактор некрозу пухлин, еритропоетин, гемопоетин і найбільш відомий і значний за обсягами впровадження людський інсулін. Рекомбінантний інтерферон свині застосовують при створенні сучасних ад'ювантів для виготовлення вакцин проти вірусних хвороб свиней, як наприклад: парвовірусна інфекція, респіраторно-репродуктивний синдром, класична чума. Рекомбінантні інтерферони та цитокіни входять до складу лікарських препаратів для профілактики та терапії вірусних і бактерійних інфекцій.

Контроль якості та безпечності імунобіологічних препаратів на основі рекомбінантних ДНК/РНК

Належний контроль якості та безпечності продуктів, що отримують із залученням технологій рекомбінантних ДНК ґрунтується на засадах комплексної оцінки якості та безпечності сировини і готової продукції в лабораторних, преклінічних і клінічних тестах.

Система контролю сировини повинна включати тести, які забезпечують досконале знання характеристик та особливостей виробничих штамів, передбачуваних генетичних конструкцій та всіх матеріалів і реактивів, які долучаються до виробничих процесів.

Система контролю сировини згідно з вимогами Recombinant DNA safety consideration (*Ad Hoc Group Of Government Experts On Safety And Regulations In Biotechnology*) включає:

- контроль якості та безпеки штаму-хазяїна;
- контроль властивостей штаму-донора;
- контроль властивостей та безпеки векторної молекули.

Контроль якості та безпеки штаму-хазяїна передбачає досконале вивчення його автентичності, контамінації сторонніми агентами, які можуть спричинити утворення продуктів з непередбачуваними властивостями генотипу, біологічних особливостей, визначення рівнів патогенності, поширення в природі та екологічні взаємозв'язки в довкіллі тощо. З метою створення вакцинних і діагностичних рекомбінантних антигенів застосовують виключно добре вивчені та, у разі створення живих вакцин, цілком апатогенні мікроорганізми в якості акцепторів генів. У разі створення інактивованих продуктів чи антигенів необхідно мати поглиблені відомості щодо фізіологічних і біохімічних властивостей акцептора, що необхідно для очищення та стандартизації готового продукту. Акцептори генів, що використовуються для створення рекомбінантних продуктів мають бути депоновані в спеціалізованих депозитаріях на світовому рівні (NIG, YGRC, ATCC, ECCC) або, хоча б, на державному рівні та мати відповідний паспорт.

Критичним аспектом є також оцінка біологічних особливостей геному донорного організму. Це зумовлено, по-перше, необхідністю знання структури та функцій геномного апарату для успішного отримання цільового продукту, по-друге, важливістю створення необхідних умов біобезпеки при роботі з патогеном, і, по-третє, для розробки системи контролювання ефективності процесу накопичення продукту власне в організмі донора гену та в експресуючій системі, отриманій на основі ДНК-технологій. Донори генів, що використовуються для створення рекомбінантних продуктів мають бути депоновані в спеціалізованих депозитаріях на державному або світовому рівні.

Контроль якості векторної ДНК-молекули полягає в ретельному вивченні її структури (теоретично – з метою визначення функціональності та практично – з метою встановлення специфічності (автентичності) вставки, стабільності вставки (як біотехнологічної при спонтанному лігюванні, так і генетичної – за кількістю передбачуваних зон мутації та наявністю нестабільних послідовностей), кодуючих здібностей вставки та їх специфічності.

Ростові субстанції досліджують загальноприйнятими методами, що використовують у класичній біотехнології.

Контролювання готової продукції здійснюється в умовах лабораторій, що мають дозвіл на роботу з рекомбінантними ДНК та патогенами відповідної групи, до якої (яких) належать донорні та акцепторні організми.

Система контролю на рівні лабораторії є продовженням процесу створення біотехнологічної розробки і полягає у валідації тої чи іншої групи препаратів.

Для діагностичних і вакцинних препаратів валідаційні характеристики полягають у визначенні автентичності та відповідності паспортним характеристикам продукуючої системи, тобто клону мікроорганізму, що

отриманий при створенні рекомбінантного продукту. При цьому за допомогою молекулярно-біологічних методів визначають специфічність вставки, експресуючу активність, динаміку експресії, а для вакцинних клонів – ще визначають можливість експресії в невластивих для вектора системах, нешкідливість, реактогенність, у деяких випадках – протективну ефективність. Цей комплекс досліджень включає як досліди *in vitro*, так і *in vivo*, із залученням лабораторних тварин.

Після валідації виробничого штаму валідується створений препарат.

Для діагностичних тестів на основі рекомбінантних антигенів встановлюють наступні валідаційні параметри:

- чутливість (діагностична + аналітична);
- специфічність (діагностична + таксономічна);
- точність;
- лінійність (для кількісних);
- повторюваність і відтворюваність;
- стабільність компонентів при зберіганні.

Для вакцин на основі рекомбінантних антигенів і ДНК-вакцин встановлюють наступні валідаційні параметри:

- специфічність;
- доза введення;
- нешкідливість;
- реактогенність;
- антигенна активність;
- імуногенна активність;
- протиепізootична ефективність (для ветеринарних препаратів);
- проєктивні властивості в умовах контрольного зараження;
- експресуюча активність;
- стабільність в організмі (для ДНК-вакцин) та при зберіганні.

До біоактивних речовин рекомбінантного походження існують наступні вимоги:

- специфічність;
- активність;
- доза введення;
- нешкідливість;
- реактогенність;
- активність в організмі;
- стабільність в організмі та при зберіганні.

Після створення та лабораторного випробування препарату в умовах лабораторії проводяться доклінічні та клінічні випробування.

Доклінічні випробування проводять в закритих системах. При цьому відбувається щонайменше річне спостереження за щепленими лабораторними тваринами, досліджується стабільність векторних ДНК-молекул (при використанні живих форм виробничих штамів і ДНК-вакцин), динаміка утворення та елімінації антитіл. При контрольному інфікуванні оцінюють

процеси виділення збудника та моніторинг його геному щодо перебудов. Цю інформацію збирають упродовж кількох пасажів.

Після доклінічних випробувань в закритій системі, у разі не виявлення негативного впливу вакцини на довкілля, препарат випробовують у відкритій системі, після чого у ветеринарній медицині його впроваджують, а у гуманній випробовують на волонтерах.

Регламентация біобезпеки при застосуванні рекомбінантних технологій

Робота з рекомбінантними ДНК має відбуватись з дотриманням засад біобезпеки. Рівень біобезпеки, який має супроводжувати дослідження з розробки, випробування та валідації рекомбінантних продуктів, на пряму залежить від потенційної небезпеки, яку становлять донорні та акцепторні штами.

Відповідно до класифікації Національного Інституту охорони здоров'я США, який є куратором у питаннях легалізації рекомбінантних продуктів з боку ВООЗ, штами-донори генів розподіляються на чотири групи патогенності.

Штами-хазяї відносяться до патогенів I–II, іноді – III групи патогенності.

При роботі з цими штамами використовують приміщення з відповідними рівнями біозахисту від I до III+.

До збудників першої групи патогенності відносяться непатогенні для людини, до другої – відносяться чинники терапевтично виліковних і мало контагіозних хвороб людини, до третьої – чинники летальних захворювань, для яких розроблені ефективні засоби лікування та профілактики, до четвертої – чинники летальних захворювань, для яких розроблені засоби лікування та профілактики є не завжди ефективними.

При застосуванні патогенних донорів генів роботи по одержанню ДНК (кДНК) фрагментів для клонування відбуваються в умовах приміщень з рівнем біозахисту II–III+, у залежності від групи ризику, до якої належить патоген, а процедури з клонування відбуваються в приміщеннях лабораторій з класом біозахисту II.

При роботі з організмами-хазяями (акцепторами) при вбудовуванні генів керуються вибором за рівнем патогенності вказаних організмів (I–III).

Якщо джерело ДНК є патогеном IV групи ризику, а хазяїнний штам – ні, процедури з клонування відбуваються у приміщеннях лабораторій з класом біозахисту II, а якщо геном патогенна є функціональним – III+. При роботі з джерелами ДНК (РНК) вірусів тварин роботи проводять у приміщеннях з рівнем біозахисту II–III+. При роботі з трансфекцією повногеномними копіями ДНК (РНК) клітин еукаріот роботи проводять у приміщеннях з рівнем біозахисту II–III+. Процедури з геномом еукаріот проводять в приміщеннях I класу біозахисту з огляду на їх неінвазивність. Безпечні для людей вірусні вектори використовують в приміщеннях I класу біозахисту.

Досліди на тваринах з рекомбінантними конструкціями проводять у віварних приміщеннях II–III класу біозахисту. У випадках необхідності проведення контрольного зараження клас біозахисту приміщення залежить від патогенності контрольного штаму. Виключенням є випробування

рекомбінантних продуктів еукаріотичного походження. Якщо їх випробування не передбачає інфікування, дослідження проводяться в віварних приміщеннях з класом біозахисту I.

Створення та випробування рекомбінантних токсинів на основі *E. coli* ($100 \text{ нг/кг} < LD50 < 1 \text{ мкг/кг}$) проводять в приміщеннях II класу біозахисту, а $1 \text{ мкг/кг} < LD50 < 100 \text{ мкг/кг}$ – I класу. Це стосується і лабораторних, і віварних приміщень.

Без дозволу ВООЗ та НІН забороняється створення клонів мікроорганізмів, що мають потенційну небезпеку для здоров'я тварин і людини, що мають штучно набуту виражену різною мірою стійкість до лікувальних засобів і такі, що продукують токсини з $LD50 100 \text{ нг/кг} - 1 \text{ мкг/кг}$.

Рекомбінантні продукти та генетичні конструкції, призначені для введення до організму людини мають бути перевірені Committee on Microbiological Safety.

Виключеннями з цього правила є рекомбінантні ДНК:

- що є не функціональними, тобто не містять старт-кодонів;
- не можуть бути репліковані незалежно в організмі, що щепиться, чи може раптово бути трансфікованим нею;
- окремі не хромосомні структури;
- якщо донор і акцептор ДНК належать до одного виду;
- якщо об'єкт клонування не являє екологічної небезпеки;
- еукаріотичні клони.

Реєстрація та дозвіл на широке застосування рекомбінантного продукту може бути даний тільки після визначення всіх його головних біологічних характеристик і доведення повної індивідуальної, популяційної та екологічної безпечності вказаного продукту.

Для ілюстрації тяжких наслідків презентації невивченого достатнім чином рекомбінантного продукту можна навести приклад. У 1991 р. з'явилося повідомлення китайських вчених про створення делеційного мутанту вірусу ТГЕС. Цей мутант показав добрі властивості в проективному відношенні та був широко випробуваний у тому ж році на кількох фермах КНР. Як наслідок ми маємо спалахи нової хвороби – РКВІС, збудник якої є делеційним мутантом вірусу ТГЕС. До речі, це захворювання трапляється й у нас в Україні, вражаючи порослят підсисного та від'ємного віку.

Це дискусійне питання, але, у науковому світі є кулуарні припущення про рукотворність вірусів нипай, пандемічних варіантів вірусу грипу, коронавірусу атипової пневмонії тощо.

Нормативна база відносно створення та застосування рекомбінантних імунобіологічних препаратів у світі та Україні

Аналізуючи устрій системи моніторингу, реєстрації та контролю біобезпеки ГМ-продуктів для ветеринарної та гуманної медицини в різних країнах світу, необхідно зазначити, що в кожній державі існує комплекс законів і підзаконних актів, які контролюють цей аспект відносин між розробниками, виробниками, споживачами та державою.

Так, у медичній сфері існує комітет з обліку рекомбінантних продуктів для гуманної медицини при ВООЗ та ООН. Цей комітет розташований при

Національному інституті охорони здоров'я в Сполучених Штатах Америки. До його задач належать облік, контроль за обігом рекомбінантних продуктів і речовин, контроль за ліцензуванням виробників і розробників ГМ-продуктів у США та світі.

Існують документи стосовно цього питання від сільськогосподарських та ветеринарних організацій, а саме постанова ЕМЕА (ЕМЕА/СVMP/004/04-FINAL) та FAO (22/01/1999), які присвячені питанням біотехнології, описують галузі застосування ГММ у ветеринарній медицині, методи контролю та процедури впровадження цих продуктів, а також елементи щодо біобезпеки при їх виготовленні та застосуванні.

З метою регламентації торгових відносин, що стосуються біотехнологічних, у т.ч. рекомбінантних, продуктів ратифікований і має аналоги в інших країнах меморандум СОТ WTO Doc. WT/DS291,292,293/R. At. Означений документ прийнято в 32 країнах.

Якщо взяти США, то в цій країні існує Recombinant DNA Advisory Committee (RAC), національний орган реєстрації медичних і ветеринарних препаратів також при Національному інституті охорони здоров'я. Цей орган виконує вказані функції на національному рівні. Нормативна база та контроль за обігом також знаходиться під наглядом з боку інших державних організацій: Food and Drug Administration (FDA), US Department of Agriculture (USDA) та Environmental Protection Agency (EPA). Законотворчі процеси в напрямку регламентації питань щодо ГММ мають в країні 30-річні традиції.

У Європейському союзі, чий досвід у контексті бажання України щодо вступу в цю конфедерацію є найбільш близьким, як модель, майже половина законів має відношення до сільського господарства. З цієї половини понад дві третини відноситься до ветеринарної медицини. Європейська політика щодо впровадження та застосування ГММ регламентується 8 директивами ЄС та 5 інструкціями, ратифікованими всіма членами ЄС. Крім того, кожна країна має відповідні місцеві органи, що контролюють обіг ветеринарних і медичних ГММ-препаратів, затверджені на рівні урядів країн протоколи з біобезпеки при роботі з рекомбінантними ДНК та їх похідними.

В Україні на сьогодні існує лише Закон України Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні ГМО від 2007 р. Цей закон не повною мірою відображає порядок ліцензування процесів створення та виробництва ГМО, у т.ч. ветеринарного та медичного призначення. Враховуючи, що мікроорганізми і корми та продукти харчування це полярно різні речі, то вони потребують відокремлених законодавчих баз і підзаконних актів. Механізми ліцензування, реєстрації, виробництва та контролю мають виконуватись ветеринарними та медичними фахівцями за допомогою профільних вчених мережі відповідних міністерств, а не чиновниками МінОсвіти. Для ефективного впровадження дієвої системи необхідна ратифікація приведених директив з урахуванням національних особливостей та можливостей:

1. European Communities (EC) (1990). – Council Directive 90/219/EC of 23 April 1990 on the contained use of genetically modified micro-organisms.

2. European Communities (EC) (1993). – Council Regulation EC No. 2309/93 of 22 July 1993 laying down Community procedures for the authorization and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.

3. European Communities (EC) (2001). – Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC.

4. European Communities (EC) (2001). – Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products.

5. European Communities (EC) (2002). – Council Decision 2002/813/EC of 3 October 2002 establishing, pursuant to Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council, the summary notification information format for notifications concerning the deliberate release into the environment of genetically modified organisms for purposes other than for placing on the market.

6. European Communities (EC) (2003). – Regulation EC No. 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC.

7. European Communities (EC) (2004). – Directive 2004/9/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP).

8. European Communities (EC) (2004). – Directive 2004/28/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/82/EC on the Community code relating to veterinary medicinal products.

9. European Communities (EC) (2004). – Regulation EC No. 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency.

10. European Medicines Agency (2004). – EMEA/CVMP/1151/04: guideline on GMOs: updated notice to applicants guidance. EMEA, London. Website: www.emea.eu.int/pdfs/.

11. European Medicines Agency (2004). – SOP-V-4012 standard operating procedure on GMOs – Article 28 – EMEA/CVMP. EMEA, London.

Враховуючи вищезазначене, необхідно приділити увагу створенню відповідної нормативної бази для розробки, випробувань та презентації виробництву рекомбінантних біопрепаратів для гуманної та ветеринарної медицини, розробці та впровадженню Національних стандартів з функціонування генно-інженерних наукових лабораторій, виготовлення та контролю рекомбінантних вакцин і діагностикумів, контролю біобезпеки та екологічної безпеки продуктів технологій рекомбінантних ДНК, що сприятиме розвитку біотехнології в державі, підвищенню конкурентоспроможності вітчизняних препаратів, а також інтенсифікуватиме процеси гармонізації

Європейської нормативної бази та інтеграції України в Європейські та світові структури.

На сьогодні розроблений та поданий на розгляд Парламентських комітетів проект Закону України “Про біологічну безпеку та біологічний захист”, розроблений у рамках міжнародного проекту ОБСЄ, а також низка підзаконних актів до нього, які стосуються регламентації роботи з рекомбінантними біологічними конструкціями.

12. Бібліографія

1. Niessen, L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin-producing fungi [Text] / L. Niessen // *Adv. Food Nutr. Res.* – 2008. – Vol. 54. – P. 81–138.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение [Текст] / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 1998. – 592 с.
3. Milos, P. Emergence of single-molecule sequencing and potential for molecular diagnostic applications [Text] / P. Milos // *Expert Review of Molecular Diagnostics.* – 2009. – Vol. 9, №. 7. – P. 659–666.
4. Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3 [Text] / B. Amstutz [et al.] // *The EMBO Journal.* – 2008. – Vol. 27, № 7. – P. 956–969.
5. Acheson, N.H. Fundamentals of Molecular Virology [Text] / N.H. Acheson // McGill Univ. – Canada, 2007. – 432 p.
6. Molecular epidemiology of viral infections [Text] / O.Hungnes [et al.] // *Apmis.* – 2000. – Vol. 108, № 2. – P. 81–97.
7. Capua, I. Vaccination for notifiable avian influenza in poultry [Text] / I. Capua // *Rev. Sci. Tech.* – 2007. – Vol. 26, № 1. – P. 217–227.
8. Capua, I. Ecology, epidemiology and human health implications of avian influenza viruses: why do we need to share genetic data? [Text] / I. Capua, D.J. Alexander // *Zoonoses Public Health.* – 2008. – Vol. 55, № 1. – P. 2–15.
9. Belák, S. Bovine viral diarrhoea virus infection: rapid diagnosis by the polymerase chain reaction [Text] / S. Belák, A. Ballagi-Pordány // *Arch. Virol. Suppl.* – 1991. – Vol. 3. – P. 181–190.
10. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups [Text] / S. Vilcek [et al.] // *Arch. Virol.* – 2001. – Vol. 146. – P. 99–115.
11. Kelling, C.L. Planning bovine viral diarrhoea virus vaccination programs [Text] / C.L. Kelling // *Veterinary Medicine.* – 1996. – № 9. – P. 873–877.
12. Alexander, D.J. Avian influenza – diagnosis [Text] / D.J. Alexander // *Zoonoses Public Health.* – 2008. – Vol. 55, № 1. – P. 16–23
13. Alexander, D.J. Orthomyxovirus infections Virus infections of birds [Text] / D.J. Alexander, J.B. McFerran, M.S. McNulty // Elsevier Science. London. – 2001. – P. 287–316.
14. Bevan, L.S. Sequencing of PCR-amplified DNA PCR [Text] / L.S. Bevan, R. Rapley, M.R. Walker // *Methods Appl.* – 1992. – Vol. 1, № 4. – P. 222–228.
15. Office international epizootical Terrestrial Code [El. source]. – Mode of access URL: http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_sommaire.htm. – 2009. – Title from the screen.
16. Office international epizootical Terrestrial Code [El. source]. – 17th Edition. – Mode of access URL: http://www.oie.int/eng/normes/mcode/code2008/en_preface.htm. – 2008. – Title from the screen.
17. Office international epizootical Manual of diagnostics tests and vaccines for terrestrial animals [El. source]. – 6th Edition. – Спосіб доступу URL: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm. – 2008. – Title from the screen.
18. LeBlanc, N. A novel combination of TaqMan RT-PCR and a suspension microarray assay for the detection and species identification of pestiviruses [Text] / N. LeBlanc [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2010. – Vol. 142, № 1–2. – P. 81–86.
19. World health organization (WHO). Avian influenza. Report of regional consultations [El. source]. – Спосіб доступу URL: http://www.searo.who.int/LinkFiles/Publication_AI_Regional_Consultation_report.pdf. – 2005. – Title from the screen.
20. World health organization (WHO). International health regulation [El. source]. – Спосіб доступу URL: <http://www.who.int/ihr/en/>. – 2005. – Title from the screen.
21. World health organization (WHO). Avian Influenza: Assessing the pandemic threat [El. source]. – Спосіб доступу URL: <http://www.who.int/csr/disease/in.uenza/H5N1-9reduit.pdf>. – 2005. – Title from the screen.

22. World health organization (WHO). World health report on-line [El. source]. – Спосіб доступу URL: <http://www.who.int/whr/2008/en/index.html>. – 2008. – Title from the screen.
23. Spackman, E. Use of a novel virus inactivation method for a multicenter avian influenza real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction proficiency study [Text] / E. Spackman, D.L. Suarez // J. Vet. Diagn. Invest. – 2005. – Vol. 17, № 1. – P. 76–80.
24. Spackman, E. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes [Text] / E. Spackman [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40, № 9. – P. 3256–3260.
25. Monti, G. Genetic diversity and spread of Bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle [Text] / G. Monti, R. Schrijver, D. Beier // Arch. Virol. – 2005. – Vol. 150, № 3. – P. 443–458.
26. Hemmatzadeh, F. Sequencing and phylogenetic analysis of gp51 gene of bovine leukaemia virus in Iranian isolates [Text] / F. Hemmatzadeh // Vet. Res. Commun. – 2007. – Vol. 31, № 6. – P. 783–789.
27. Sachse, K. PCR detection of microbial pathogens: methods and protocols. Methods in Molecular Biology [Text] / K. Sachse, J. Frey // Humana Press. – 2003. – Vol. 216. – 336 p.
28. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene [Text] / E.W. Aldous [et al.] // Avian Pathol. – 2003. – Vol. 32, № 3. – P. 239–256.
29. Молекулярно-биологическая характеристика изолятов вируса птичьего гриппа, выделенных на территории Российской Федерации и Автономной республики Крым [Текст] / А.В. Андриясов [и др.] // Материалы II Междунар. вет. конгр. по птицеводству. – М., 2006. – С. 59–65.
30. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR [Text] / J. Kim [et al.] // Vet. Rec. – 2001. – Vol. 149, № 10. – P. 304–305.
31. Werner, O. Avian Influenza [Text] / O. Werner, T.C. Harder // Influenza report. – 2006. – Ch. 2. – P. 48–69.
32. Hierhozer, J.C. Virus isolation and quantitation [Text] / J.C. Hierhozer, R.A. Killington // Virology Methods Manual / B.W.J. Mahy and H.O. Kangro (ed.). – London: Academic Press, 1996. – P. 25–34.
33. Cid-Arregui, A. Viral vectors [Text] / A. Cid-Arregui, A. Garcia-Carranca. – A Bio Techniques Books Publication Eaton Publishing, 2000. – 652 p.
34. Triche, T.J. Molecular Genetic Techniques in Surgical Pathology [Text] / T.J. Triche // Clinical Biochemistry. – 1995. – Vol. 28, № 3. – P. 352.
35. Molecular genetics: piecing it together [El. source] / Спосіб доступу URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/genetics_molecular.html – Title from the screen.
36. Молекулярная генетика [Эл. ресурс]. – Режим доступа: URL: <http://www.bse.scilib.com/article077555.html>. – Заголовок с экрана.
37. Pesavento, P.A. Molecular virology of feline calicivirus [Text] / P.A. Pesavento, K.O. Chang, J.S. Parker // Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. – 2008. – Vol. 38, № 4. – P. 775–786.
38. Prado, M.E. Immunogenicity of iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A: 3 in cattle: molecular characterization of the immunodominant heme acquisition system receptor (HasR) protein [Text] / M.E. Prado, S.M. Dabo, A.V. Confer // Vet. Microbiol. – 2005. – Vol. 105, № 3–4. – P. 269–280.
39. Verfaillie, T. Immunostimulatory capacity of DNA vaccine vectors in porcine PBMC: a specific role for CpG-motifs? [Text] / T. Verfaillie, E. Cox, B.M. Goddeeris // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2005. – Vol. 103, № 1–2. – P. 141–151.
40. Identification of novel alpha- and gammaherpesviruses from cutaneous and mucosal lesions of dolphins and whales [Text] / K.A. Smolarek Benson [et al.] // J. Virol. Methods. – 2006. – Vol. 136, № 1–2. – P. 261–266.
41. Molecular characterization of foot-and-mouth disease virus in Hong Kong during 2001–2002 [Text] / C. Jinding [et al.] // Virus. Genes. – 2006. – Vol. 32, № 2. – P. 139–143.

42. *Genome-sequence* analysis of the pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated in China in 2004 [Text] / H. Zhou [et al.] // *Virus. Genes.* – 2006. – Vol. 32, № 1. – P. 85–95.
43. *Cell* biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in cell cultures and in pigs with emphasis on the respiratory tract [Text] / N. Nauwynck [et al.] // *Vet. Res.* – 2007. – Vol. 38, № 2. – P. 229–241.
44. *Orthomyxo-*, paramyxo- and flavivirus infections in wild waterfowl in Finland [Text] / E. Lindh [et al.] // *Virolog. J.* – 2008. – Vol. 28, № 5. – P. 35.
45. *Risk* factors for clustering of tuberculosis cases: a systematic review of population-based molecular epidemiology studies [Text] / A. Fok [et al.] // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* – 2008. – Vol. 12, № 5. – P. 480–492.
46. *Ault, K.A.* Human papillomavirus vaccines and the potential for cross-protection between related HPV types [Text] / K.A. Ault // *Gynecol. Oncol.* – 2007. – Vol. 107, № 2, Suppl. 1. – P. 31–33.
47. *Classification* of viruses [El. source]. – Mode of access: URL: <http://www.nlv.ch/Virologytutorials/Classification.htm>. – Title from the screen.
48. *Transgenic* animal production and animal biotechnology [Text] / J.M. Robl [et al.] // *Theriogenology.* – 2007. – Vol. 1, № 67. – P. 127–133.
49. *Roth, J.A.* New technology for improved vaccine safety and efficacy [Text] / J.A. Roth, L.M. Henderson // *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* – 2001. – Vol. 17, № 3. – P. 585–597.
50. *Quantification* of two variant strains contained in freeze-dried Japanese BCG vaccine preparation by real-time PCR [Text] / K. Shibayama [et al.] // *Biologicals.* – 2007. – Vol. 35, № 2. – P. 139–143.
51. *Fedson, D.S.* Vaccination for pandemic influenza: a six point agenda for interpandemic years [Text] / D.S. Fedson // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2004. – Vol. 23, № 1. – P. 74–77.
52. *Neuraminidase* assays. [Text] / M. Aymard [et al.] // *Dev. Biol. (Basel).* – 2003. – Vol. 115. – P. 75–183.
53. *Bruckner, L.* Pre-validation study for testing of avian viral vaccines for extraneous agents by PCR [Text] / L. Bruckner, H.P. Ottiger // *Pharmeuropa Bio.* – 2007. – Vol. 2007, № 1. – P. 15–18.
54. *Niessen, L.* PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin-producing fungi [Text] / L. Niessen // *Adv. Food Nutr. Res.* – 2008. – Vol. 54. – P. 81–138.
55. *Zhang, C.* Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends [Text] / C. Zhang, D. Xing // *Nucleic. Acids. Res.* – 2007. – Vol. 35, №13. – P. 4223–4237.
56. *Fadly, A.* Detection of reticuloendotheliosis virus in live virus vaccines of poultry [Text] / A. Fadly, M.C. Garcia // *Dev. Biol. (Basel).* – 2006. – Vol. 126. – P. 301–305.
57. *Identification* and characterization of avian retroviruses in chicken embryo-derived yellow fever vaccines: investigation of transmission to vaccine recipients [Text] / A.I.Hussain [et al.] // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77, № 2. – P. 1105–1111.
58. *Розробка* тест-системи ПЛР для контролю контамінації ветеринарних імунобіологічних препаратів мікоплазмами [Текст] / В.В. Андрющенко [та ін.] // *Вет. медицина: мідвід. темат. наук. зб.* – X., 2007. – Вип. 88. – С. 21–25
59. *COMMISSION DECISION* 2000/608/EC of 27 September 2000 concerning the guidance notes for risk assessment outlined in Annex III of Directive 90/219/EEC on the contained use of genetically modified micro-organisms [Text]. – 2000. – 18 p.
60. *PCR* identification of ruminant tissue in raw and heat-treated meat meals [Text] / J.C. Ha [et al.] // *J. Food Prot.* – 2006. – Vol. 69, № 9. – P. 2241–2247.
61. *Brzezinski, J.L.* Detection of sesame seed DNA in foods using real-time PCR [Text] / J.L. Brzezinski // *J. Food Prot.* – 2007. – Vol. 70, № 4. – P. 1033–1036.
62. *Naimuddin, M.* Genome analysis technologies: towards species identification by genotype [Text] / M. Naimuddin, K. Nishigaki // *Brief Funct Genomic Proteomic.* – 2003. – Vol. 1, № 4. – P. 356–371.
63. *Ding, C.* Quantitative analysis of nucleic acids – the last few years of progress [Text] / C. Ding, C.R. Cantor // *J. Biochem. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 37, № 1. – P. 1–10.

64. *Mardis, E.R.* Next-generation DNA sequencing methods [Text] / E.R. Mardis // *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* – 2008. – Vol. 9. – P. 387–402.
65. *Becker-Andre, M.* Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY) [Text] / M. Becker-Andre, K. Hahlbrock // *Nucleic. Acids Res.* – 1989. – Vol. 17, № 22. – P. 9437–9446.
66. *Heminested* PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses [Text] / P.R. Heaton [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35, № 11. – P. 2762–2766.
67. *Alwine, J. C.* Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzoyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes [Text] / J.C. Alwine, D.J. Kemp, G.R. Stark // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1977. – Vol. 74. – P. 5350–5354.
68. *Evaluating* test statistics to select interesting genes in microarray experiments [Text] / C. Kooperberg, C. [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2002. – Vol. 11. – P. 2223–2232.
69. *Kim, O.* Optimization of in situ hybridization assay using non-radioactive DNA probes for the detection of canine herpesvirus (CHV) in paraffin-embedded sections [Text] / O. Kim // *J. Vet. Sci.* – 2004. – Vol. 5, № 1. – P. 71–73.
70. *Effect* of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus [Text] / T. Opriessnig [et al.] // *Vet. Pathol.* – 2003. – Vol. 40, № 5. – P. 521–529.
71. *Tolmachov, O.* Designing plasmid vectors [Text] / O. Tolmachev // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 542. – P. 117–129.
72. *Current* status of veterinary vaccines [Text] / E.N. Meeusen [et al.] // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2007. – Vol. 20, № 3. – P. 489–510.
73. *Yokoyama, N.* Recombinant viral vector vaccines for the veterinary use [Text] / N. Yokoyama, K. Maeda, T. Mikami // *J. Vet. Med. Sci.* – 1997. – Vol. 59, № 5. – P. 311–322.
74. *Development* and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza [Text] / M. Bublot [et al.] // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2006. – Vol. 1081. – P. 193–201.
75. *Recombinant* haemagglutinin neuraminidase antigen-based single serum dilution ELISA for rapid serological profiling of Newcastle disease virus [Text] / C. M. Mohan [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2006. – Vol. 138, № 1–2. – P. 117–122.
76. *Characterization* of monoclonal antibodies against bovine herpesvirus 1 gD fusion protein expressed in *E. coli* [Text] / J.R. Lyaku [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 1999. – Vol. 83, № 1–2. – P. 83–89.
77. *Production* of a baculovirus-derived gp50 protein and utilization in a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pseudorabies virus [Text] / I. Prud'homme [et al.] // *Can. J. Vet. Res.* – 1997. – Vol. 61, № 4. – P. 286–291.
78. *Current* status of veterinary vaccines [Text] / E.N. Meeusen [et al.] // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2007. – Vol. 20, № 3. – P. 489–510.
79. *Hruby, D.E.* Vaccinia virus vectors: new strategies for producing recombinant vaccines [Text] / D.E. Hruby // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1990. – Vol. 3, № 2. – P. 153–170.
80. *Moss, B.* Vaccinia virus expression vector: a new tool for today immunologists [Text] / B. Moss // *Immunol.* – 1985. – Vol. 6. – P. 243–245.
81. *Immunization* with vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D: long-term protection and effect of revaccination [Text] / J. F. Rooney [et al.] // *Virol.* – 1988. – Vol. 62. – P. 1530–1534.
82. *Minke, J.M.* Equine viral vaccines: the past, present and future [Text] / J.M. Minke, J. C. Audonnet, L. Fischer // *Vet. Res.* – 2004. – Vol. 35. – P.425–443.
83. *Kahn, L.H.* Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine [Text] / L.N. Kahn // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 12. – P. 556–561.
84. *Current* status of veterinary vaccines [Text] / E.N. Meeusen [et al.] // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2007. – Vol. 20, № 3. – P. 489–510.
85. *Heppell, J.* Application of DNA vaccine technology to aquaculture [Text] / J. Heppell, H. L. Davis // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2000. – Vol. 43. – P. 29–43.

86. *Powell, K.* DNA vaccines—back in the saddle again? [Text] / K. Powell // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 799–801.
87. *In vivo* electroporation improves immune responses to DNA vaccination in sheep [Text] / J.P. Scheerlinck [et al.] // *Vaccine.* – 2004. – Vol. 22. – P. 1820–1825.
88. *Long-term* survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial [Text] / P.J. Bergman [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9. – P. 1284–1290.
89. *Mir, L.M.* Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenotherapy): past, current, and future [Text] / L.M. Mir // *Mol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 43. – P.167–176.
90. *Dormann, J.* Molecular epidemiology and DNA technology transfer [Text] // J. Dormann. – Epitask force. – 2001. – P. 8.
91. *Каминский, Г. Д.* Молекулярная эпидемиология [Текст] / Г.Д. Каминский, В.Д. Беляков, Р.Х. Яфаев. – М., 1989. – С. 84–92.
92. *Молекулярная* клиническая диагностика. Методы [Текст]: пер. с англ. / под ред. С. Херрингтона и Дж. Макги. – М., 1999. – 558 с.
93. *Макаров, В.В.* Молекулярная эпизоотология – основные определения (вместо введения) [Текст] / В.В. Макаров, В.В. Дрыгин // *Аграр. Россия.* – 2002. – № 2. – С. 10–14.
94. *Gorelenkov, V.* Set of novel tools for PCR primer design [Text] / V. Gorelenkov [et al.] // *Biotechniques.* – 2001. – Vol. 31, № 6. – P. 1326–1330.
95. *Hall, T.A.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [Text] / T.A. Hall // *Nucl. Acids. Symp. Ser.* – 1999. – P. 95–98.
96. *Foxman, B.* Molecular epidemiology: Focus on infection [Text] / B. Foxman // *Am. J. of Epidemiology.* – 2001. – Vol. 153, № 12. – P. 1135–1141.
97. *Blais, B.W.* Cloth-based hybridization array system for the identification of antibiotic resistance genes in Salmonella [Text] / B.W. Blais, M. Gauthier // *Methods Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 34. – P. 59–75.
98. *Chotár, M.* Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR [Text] / M. Chotár, B. Vidová, A. Godány // *Folia Microbiol.* – 2006. – Vol. 51, № 6. – P. 639–646.
99. *Rapid* separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR [Text] / H. Fukushima [et al.] // *Appl. Environ Microbiol.* – 2007. – Vol. 73, № 1. – P. 92–100.
100. *In situ* DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens [Text] / A. Lermo [et al.] // *Biosens Bioelectron.* – 2007. – Vol. 15, № 22. – P. 2010–2017.
101. *Wagner, R.D.* Efficacy and food safety considerations of poultry competitive exclusion products [Text] / R.D. Wagner // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2006. – Vol. 50, № 11. – P. 1061–1071.
102. *Persistence* of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure [Text] / S.K. Grewal [et al.] // *Appl. Environ Microbiol.* – 2006. – Vol. 72, № 1. – P. 565–574.
103. *Real-time* nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of hepatitis A virus [Text] / K.H. Abd el-Galil [et al.] // *Appl. Environ Microbiol.* – 2005. – Vol. 71, № 11. – P. 7113–7116.
104. *Moon, G.S.* Optimization of rapid detection of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes by PCR and application to field test [Text] / G.S. Moon, W.J. Kim, W.S. Shin // *J. Food Prot.* – 2004. – Vol. 67, № 8. – P. 1634–1640.
105. *Hauck, R.* Detection of Histomonas meleagridis DNA in different organs after natural and experimental infections of meat turkeys [Text] / R. Hauck, D. Lüscho, H.M. Hafez // *Avian Dis.* – 2006. – Vol. 50, № 1. – P.35–38.
106. *Kaderali, L.* Primer design for multiplexed genotyping [Text] / L. Kaderali // *Methods Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 402. – P. 269–286.
107. *Multiplex* PCR: optimization and application in diagnostic virology [Text] / E.M. Elnifro [et al.] // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2000. – Vol. 13, № 4. – P. 559–570.

108. *Viljoen, G.J.* Molecular Diagnostic PCR Handbook [Text] / G.J. Viljoen // Methods in Molecular Biology. – 2005. – Vol. 92 – P. 345.
109. *Meltzer, S.J.* PCR in Boanalysis [Text] / S.J. Meltzer // Methods in Molecular Biology. – 2001. – Vol. 92. – P. 274.
110. *Genome-wide* mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line [Text] / A.Nowrouzi [et al.] // J. Gen. Virol. – 2006. – Vol. 87, № 5. – P. 1339–1347.
111. *Chang, K.S.* Diversity (polymorphism) of the meq gene in the attenuated Marek's disease virus (MDV) serotypes 1 and MDV-transformed cell lines [Text] / K.S. Chang, K. Ohashi, M. Onuma M. // J. Vet. Med. Sci. – 2002. – Vol. 64, № 12. – P. 1097–1101
112. *Glycoprotein* gE-negative pseudorabies virus has a reduced capability to infect second- and third-order neurons of the olfactory and trigeminal routes in the porcine central nervous system [Text] / W.A. Mulder [et al.] // J. Gen. Virol. – 1994. – Vol. 75, № 11. – P. 3095–3106.
113. *Clinical* protection against caprine herpesvirus 1 genital infection by intranasal administration of a live attenuated glycoprotein E negative bovine herpesvirus 1 vaccine [Text] / J. Thiry [et al.] // BMC Vet. Res. – 2007. – Vol. 5, № 3. – P. 33.
114. *Stalder, H.P.* Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland [Text] / H.P. Stalder [et al.] // Prev. Vet. Med. – 2005. – Vol. 72. – P. 37–41.
115. *Intratumoral* injection of an adenovirus expressing interleukin 2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model [Text] / C.L. Addison [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1995. – Vol. 92. – P. 8522–8526.
116. *Gene* therapy with recombinant adenovirus vectors: Evaluation of the immune response [Text] / M. Christ [et al.] // Immunol. Lett – 1997. – Vol. 57. – P. 19–25.
117. *Detection* of hog cholera and differentiation from other pestiviruses by polymerase chain reaction [Text] / B. Wirz, B. [et al.] // Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31. – P. 1148–1154
118. *Development* of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of HIV-1, HIV-2, HTLV-I and HTLV-II [Text] / A. Heredia [et al.] // Clin. Diagn. Virol. – 1996. – Vol. 7. – P. 85–92.
119. *Materniak, M.* Isolation and partial characterization of bovine foamy virus from Polish cattle [Text] / M. Materniak, L. Bicka, J. Kuźmak // Pol. J. Vet. Sci. – 2006. – Vol. 9, № 4. – P. 207–2011.
120. *Short* description of an alternative simplified method for screening recombinant clones within the «AdEasy-System» by Duplex-PCR [Text] / D. Antolovic [et al.] // BMC Biotechnol. – 2005. – Vol. 11, № 5. – P. 1.
121. *Staden, R.* The Staden Package [Text] / R. Staden, K.F. Beal, J.K. Bonfield // Methods Mol. Biol. – 1998. – Vol. 2000, № 132. – P. 115–130.
122. *The* ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [Text] / J.D. Thompson [et al.] // Nucleic Acids Research. – 1997. – Vol. 24. – P. 4876–4882.
123. *Kimura, M.* A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [Text] / M. Kimura // Journal of Molecular Evolution. – 1980. – Vol. 16. – P. 111–120.
124. *MEGA2:* molecular evolutionary genetics analysis software. [Text] / S. Kumar [et al.] // Bioinformatics. – 2001. – Vol. 7. – P. 1244–1245.
125. *Koehl, P.* Protein topology and stability define the space of allowed sequences [Text] / P. Koehl, M. Levitt // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99, № 3. – P. 1280–1285.
126. *Wong, A.K.* A multiple sequence comparison method [Text] / A.K. Wong, S.C. Chan, D.K. Chiu // Bull. Math. Biol. – 1993. – Vol. 55, № 2. – P. 465–486.
127. Clustalw online. [El. source]. – Mode of access: URL: www.ebi.ac.uk/clustalw. – Title from the screen.
128. Fasta online [El. source]. – Mode of access: URL: www.ebi.ac.uk/fasta33. – Title from the screen.
129. *DnaSP,* DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [Text] / J. Rozas [et al.] // Bioinformatics. – 2003. – Vol. 19. – P. 2496–2497.

130. *Innan, H.* A statistical test for the difference in the amounts of DNA variation between two populations [Text] / H. Innan, F. Tajima // *Genetical Research*. – 2002. – Vol. 80. – P. 15–25.
131. *Ishii, K.* Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR [Text] / K. Ishii, M. Fukui // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – Vol. 67. – P. 3753–3755.
132. A broad spectrum PCR method for the detection of polyomaviruses and avoidance of contamination by cloning vectors [Text] / C. Völter [et al.] // *Dev. Biol. Stand.* – 1998. – Vol. 94. – P. 137–142.
133. *Parks, S.B.* Real-time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes for the detection of prevalent mutations causing common thrombophilic and iron overload phenotypes [Text] / S B. Parks, B.W. Popovich, R.D. Press // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2001. – Vol. 115. – P. 439–447.
134. *Biotechnical* use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples [Text] / P.G. Lantz [et al.] // *Biotechnol. Ann. Rev.* – 2000. – Vol. 5. – P. 87–130.
135. *McCulloch, R.K.* An evaluation of competitor type and size for use in the determination of mRNA by competitive PCR [Text] / R.K. McCulloch, C.S. Choong, D.M. Hurley // *PCR Meth. Appl.* – 1995. – Vol. 4. – P. 219–226.
136. *Innis, M.A.* Optimization of PCRs, in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* [Text] / M.A. Innis [et al.]. – New York: Academic Press, 1990. – P. 3–12.
137. *Validation* and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases [El. source]. – 2012 updated Manual Of Diagnostic Tests And Vaccines For Terrestrial Animals. – Mode of access: URL: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00014.htm. – 2012. – Title from the screen.
138. *Louie, M.* The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases [Text] / M. Louie, L. Louie, A.E. Simor // *CMAJ*. – 2000. – Vol. 163, № 3. – P. 301–309.
139. *Fredricks, D.N.* Application of polymerase chain reactions to the diagnosis of infectious diseases [Text] / D.N. Fredricks, D.A. Relman // *Clin. Infect. Dis.* – 1999. – Vol. 29. – P. 475–488.
140. *Kovarova, M.* New specificity and yield enhancer of polymerase chain reaction [Text] / M. Kovarova, P. Draber // *Nucleic Acids. Res.* – 2000. – Vol. 28, № 1. – P. 70.
141. *Групп (обзор литературы)* [Текст] / Н.С. Дудникова [и др.]. – Владимир, 2005. – 59 с.
142. *Вирусные болезни животных* [Текст] / В.Н. Сюрин [и др.]. – М.: ВНИТИБП, 1998. – 928 с.
143. *Генетика и эволюция вирусов гриппа* [Текст] / под ред. М.И. Соколова. – М.: Медицина, 1981. – 215 с.
144. *Werner, O.* Avian Influenza [Text] / O. Werner, T.C. Harder // *Influenza report*. – 2006. – Ch. 2. – P. 48–69.
145. *Биохимия* / Под ред. Е.С. Северина. — М., 2003; Гонський Я.І., Максимчук Т.П. Біохімія людини. — Тернопіль, 2001; Губський Ю.І. Біологічна хімія. — К. — Тернопіль, 2000; Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2 т. — М., 1993. — Т. 2.

**ГЕРІЛОВИЧ Антон Павлович
ЄРОШЕНКО Галина Анатоліївна
КОРОВІН Ігор Вікторович
КІНАШ Оксана Вячеславівна
ГЕРІЛОВИЧ Ірина Олександрівна
РОДИНА Наталія Сергіївна**

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ

(Українською мовою)

Шановний читач!

Ваші зауваження та пропозиції щодо змісту книги та її оформлення просимо надсилати за адресою:

ГО “Інститут Єдиного Здоров’я”
antger2011@gmail.com, prezyd.o.h.institute@gmail.com