

УДК 577 616.98:578.825.11

С.С.Емельянова (5 курс, каф. ЭФ),
Е.А.Соловьева (5 курс, ФмедФ, каф. физико-химических основ медицины),
Г.Р.Виноградская, к.б.н., с.н.с. (ОМРБ ПИЯФ РАН)

ПОДГОТОВКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ПЦР-ДИАГНОСТИКУМА С КОНКУРЕНТНЫМ СТАНДАРТОМ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

При иммуносупрессии организма у больных СПИДом, реципиентов органов и костного мозга цитомегаловирус часто является причиной серьезных заболеваний, нередко заканчивающихся летальным исходом. В последние годы отмечается рост числа больных, имеющих ту или иную степень иммунодефицита, и, соответственно, возрастает актуальность цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) [1]. Клинические проявления ЦМВИ разнообразны, серьезны и сходны с проявлениями других заболеваний, а противовирусная терапия является строго специфичной и высокотоксичной. Кроме того, в курсе лечения может развиваться резистентность к лекарственным препаратам [2]. Все это, а также необходимость начать лечение до развития клинических симптомов и определяет основные требования к методам диагностики. К ним относятся точность, высокая чувствительность и возможность количественных оценок вирусной ДНК в клинических образцах. Это позволит безошибочно указывать природу инфекции, обнаруживать и оценивать даже небольшие количества вирусной ДНК в образце, а также проводить оперативный мониторинг противовирусной терапии.

Всем этим требованиям отвечает метод, основанный на количественной конкурентной полимеразной цепной реакции (ПЦР) [3]. Принцип метода состоит в одновременной амплификации в одной пробирке природной мишени и конкурентного стандарта, концентрация которого известна. Эффективность размножения обеих матриц одинакова, поэтому конечное отношение концентраций продуктов амплификации, которое можно оценить по электрофореграмме, отражает начальное соотношение матриц. Количество ДНК в пробе можно определить путем нахождения эквивалентной точки, в которой сигналы от обеих матриц равны.

Общей целью данного проекта является исследование динамики развития ЦМВИ у реципиентов костного мозга для создания схемы мониторинга инфекции и противовирусной терапии.

Целью данного этапа работы являлась подготовка системы диагностики, основанной на конкурентной полимеразной цепной реакции, к количественным исследованиям цитомегаловирусной инфекции.

В наши задачи входила проверка конкурентного стандарта, представляющего собой плазмиду с клонированным в нее ампликоном с внутренней делецией. Необходимо было надежно оценить его концентрацию и определить особенности его амплификации в условиях четырехпраймерной двухстадийной ПЦР.

Подготовка диагностикума включала следующие этапы: трансформация, выделение плазмидной ДНК, рестрикция плазмиды, четырехпраймерная ПЦР, электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ), электрофорез в агарозном геле, электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях.

Методом электропорации трансформировали бактериальный штамм *E.coli DH5 α* . плазмидой с клонированным делетированным ампликоном для ее естественного размножения.

Методом щелочного лизиса плазида была выделена и очищена. Для исключения различий в кинетике денатурации кольцевой и линейной форм ДНК плазмиду линеаризовали с помощью рестрикции по *EcoRI* сайту.

С помощью электрофореза в агарозном геле проверили чистоту выделения плазмиды и качество ее линейаризации.

Выделенную плазмиду исследовали в условиях четырехпраймерной двухстадийной ПЦР, визуализировав результаты на электрофореграмме.

Сопоставлены оценки концентраций конкурентного стандарта, полученные тремя методами: определением количества ДНК с помощью спектрофотометрических измерений, методом "пятен" и методом конечных разбавлений с помощью ПЦР. Совпадение результатов, полученных разными методами, позволило оценить чувствительность количественной конкурентной ПЦР в 1-2 геном-эквивалента на реакцию. Такая чувствительность является достаточно высокой для исследования всех групп больных.

Выводы. Система диагностики ЦМВИ, основанная на принципе конкурентной ПЦР, подготовлена к количественным исследованиям. В дальнейшем предполагается провести исследования ЦМВИ у реципиентов костного мозга, так как именно у этой группы пациентов наиболее актуальна предсимптоматическая диагностика ЦМВИ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Dal Monte P., Lazzarotto T., Ripalti A., Landini M.P./ Human cytomegalovirus infection: a complex diagnostic problem in which molecular biology has induced a rapid evolution. Intervirology. 1996. 39: 193-203.
2. Герпесвирусные инфекции: лекарственные препараты и ПЦР-мониторинг терапии / О.И. Киселев, Г.Р. Виноградская, М.А. Стукова, В.И Руденко; Под общ. ред. О.И. Киселева. СПб.: РИФ «Роза мира», 1999. 80 с.
3. Количественный конкурентный ПЦР-диагностикум для мониторинга цитомегаловирусной инфекции и противовирусной терапии / Г.Р. Виноградская, М.Г. Драбкина, М.А. Стукова, О.И. Киселев, В.А. Ланцов // Молекулярная биология. 1999, 33(5): 898-904.