

Г. Р. Виноградская, И. Ю. Горышкин, Л. Н. Новикова, О. В. Плуталов,
М. А. Башмакова, Ю. А. Берлин, В. А. Цинзерлинг,
Е. И. Шварц, В. А. Ланцов

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР) ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ: ЦИТОМЕГАЛОВИРУС ЧЕЛОВЕКА

Описана процедура быстрого, чувствительного и точного определения цитомегаловируса (ЦМВ) в тканях и биологических жидкостях человека с помощью термофильной ДНК-полимеразы из *Thermus thermophilus*. Процедура состоит из двух последовательных ПЦР. Первая включает 40 циклов (денатурация ДНК, отжиг праймеров и ДНК-полимеризация), выполняемых с двумя праймерами по 20 оснований, консервативная последовательность которых взята из гена *MIE* (major immediate early) ЦМВ. Вторая реакция включает от 20 до 50 циклов, аналогичных первым, но на основе 20-членных праймеров, фланкирующих внутреннюю часть фрагмента ДНК, намноженного ранее. Конечный фрагмент обнаруживается по окрашиванию бромистым этидием после электрофореза в полиакриламидном геле. Верификация искомой полосы включает ее рестрикционный анализ. С помощью плазмиды *pCM5018*, несущей ген *MIE* вируса, показано, что предлагаемая процедура может выявлять столь малые количества ДНК, как несколько (от 1 до 5) плазмидных молекул.

Введение. Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) относится к числу широко распространенных заболеваний человека. Поражая детей раннего возраста и плод, она может стать причиной умственного недоразвития, глухоты, иммунного дефицита и целого ряда других аномалий [1].

Комплексное применение современных методов выявления МЦВИ (вирусологические, иммунофлуоресцентные, серологические, электронно-микроскопические и др.) раскрыло нарастающую картину распространности ЦМВ (лит. см. в [1]). Оказалось, что от 40 до 100% взрослых людей разных стран имеют антитела к ЦМВ, т. е. были в контакте с данным вирусом или являются его носителями; 0,5—2% всех новорожденных и 49—60% детей раннего возраста инфицированы ЦМВ. По данным ВОЗ, частота летальных исходов (~2%) ЦМВИ не уступает таковой гриппозных инфекций.

Все это свидетельствует о важности развития точных экспресс-методов диагностики ЦМВИ, особенно для целей диагностики у беременных и внутриутробного плода.

Появление нового диагностического приема ПЦР [2], столь успешно используемого для молекулярного анализа генетических нарушений у человека, не могло оставить в стороне и диагностику ЦМВ [3]. Отметим, что на недавней 89-й Ежегодной встрече Американского общества микробиологов из 20 работ, посвященных диагностике ЦМВ, четыре были выполнены с помощью ПЦР [4—7].

В настоящей работе представлены результаты применения ПЦР на основе ДНК-полимеразы из *T. thermophilus* для отработки эффективного, чувствительного и точного экспресс-метода выявления ЦМВ в биологических жидкостях и тканях людей, зараженных вирусом. Результаты исследования приведены ранее [8].

Материалы и методы. Плазмида *pCM5018* [9] построена на основе бактериального вектора *pACYC184* и содержит фрагмент вирусной ДНК в районе гена *MIE*. Она не содержит ДНК человека.

Выделение ДНК из тканей человека, приготовленных для стандартных гистологических исследований (фиксированных в формалине, парафинированных), проводили согласно [10] с незначительными модификациями. После удаления парафина образцы нарезали на пробы по 50 мг. Пробу помещали в 5 мл буфера TE9 (500 мМ трис, 20 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl, pH 9,0), содержащего 1% DS-Na

и 500 мкг/мл проназы R («Calbiochem», США), и встряхивали при 48 °С в течение суток. Затем к пробе вновь добавляли проназу R (до 1 мкг/мл) и DS-Na (до 2 %) и продолжали инкубировать еще 40 ч в тех же условиях. ДНК экстрагировали добавлением равного объема смеси фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (в соотношении 25 : 24 : 1) и дополнительно дважды обрабатывали равным объемом хлороформа. После осаждения ДНК изопропиловым спиртом ее промывали 70 %-ным этанолом, сушили и ресуспендировали в 100 мкл воды.

Выделение ДНК из мочи. Пробы по 15 мл сохраняли замороженными. После оттаивания их центрифугировали (2 мин, 2—3 тыс. об/мин), к супернатанту добавляли 7,5 мл 30 %-ного полиэтиленгликоля-6000 («Merck», ФРГ), приготовленного в 3 М NaCl, выдерживали 30 мин во льду и центрифугировали еще раз в течение 40 мин (10 000 об/мин) при 0 °С. Осадок ресуспендировали в 200 мкл ТЕ-буфера (100 мМ трис, 150 мМ NaCl, 10 мМ ЭДТА, pH 8,5), содержащего 1 % DS-Na и 0,004 % проназы, и инкубировали в течение 2 ч при 48 °С. После двух экстракций ДНК добавлением равного объема смеси фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (см. выше) в водную фазу добавляли $MgCl_2$ в концентрации 10 мМ и 2,5 объема холодного этилового спирта. Смесь выдерживали в течение ночи при —20 °С. После центрифугирования и отмывки осадок растворяли в 100 мкл воды.

Концентрацию ДНК в пробе определяли методом сравнения со шкалой стандартов пятна, прокрашенного бромистым этидием [11].

ПЦР проводили в объеме 50 мкл в условиях, отработанных для полимеразы из *T. thermophilus* [12]. Реакционная смесь содержала ТЕ-буфер (16,6 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 67 мМ трис-HCl, pH 8,5—8,8, 6,7 мМ $MgCl_2$, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 6,7 мМ ЭДТА), бычий сывороточный альбумин (170 мкг/мл), все четыре дезокситрифосфата (1,25 мМ), праймеры — 2 пмоль для первой пары праймеров и 10 пмоль для второй пары и 5—10 мкл исследуемой ДНК. Реакционную смесь покрывали вазелиновым маслом и выдерживали 5—10 мин при 98 °С. Затем добавляли 1 ед. термофильной полимеразы и запускали реакцию в следующем температурном режиме: 1 мин при 94, 1 мин при 55 и 2 мин при 70—72 °С.

Расщепление амплифицированной ДНК рестриктазой *BamHI* (НПО «Фермент», Вильнюс) проводили в буфере, используемом для ПЦР.

Электрофорез осуществляли в 6 %-ном полиакриламидном геле.

Результаты и обсуждение. Использование ПЦР для диагностики инфекционного заболевания основано на возможности с ее помощью визуализировать наследственное вещество возбудителя данного заболевания с последующей его верификацией. Действительно, применяя ПЦР можно амплифицировать заданный фрагмент ДНК, извлечь его и верифицировать различными молекулярными методами, такими как гибридизация с известной меченой последовательностью ДНК, расщепление амплификата в определенном сайте рестриктазой и даже секвенирование амплифицированной ДНК.

ЦМВ человека относится к семейству ДНК-овых герпетических вирусов [1]. Для амплификации мы выбрали фрагмент размером 257 н. п. из конца структурной части гена *MIE* ЦМВ, нуклеотидная последовательность которого была опубликована [13]. Структуры левого и правого праймеров выбраны соответственно: 5'TGTGTCTGTCAAGTCTGAGC3', 5'TTTCACAGGCGTGACACGTT3'. Амплифицированный фрагмент содержал сайт эндонуклеазной рестрикции *BamHI*, который использовали для верификации амплификата.

Примеры ПЦР-анализа как контрольного (плазмида *pCM5018*), так и испытуемого (секционный материал: печень человека) материала приведены на рис. 1 (а и б). Из 14 образцов секционного матери-

ала, показывавших типичную морфологическую картину цитомегалических клеток, только 9 дали положительный ответ, пример которого представлен на рис. 1. Варьирование экспериментальных условий — внесение лишь ограниченного количества праймеров на первых циклах амплификации с последующим разбавлением и внесением большого количества праймеров на последующих циклах, увеличение числа циклов амплификации до 100 — не дало результата. Более того, при увеличении

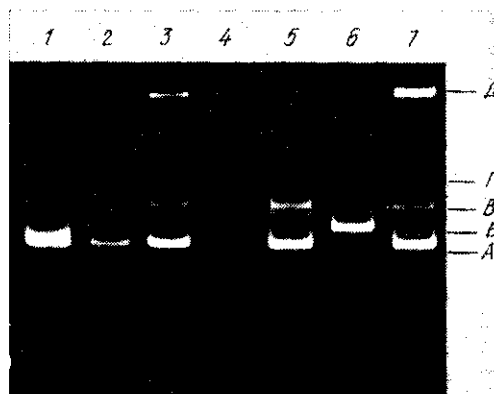
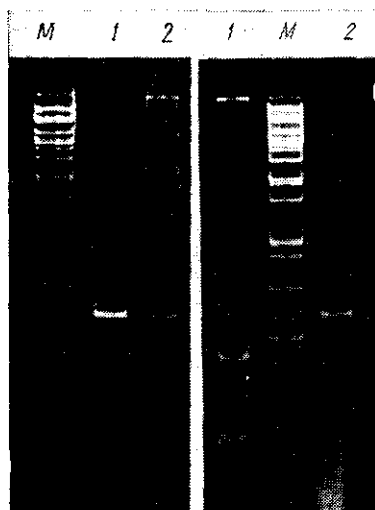


Рис. 1. Электрофореграммы фрагмента ДНК ЦМВ после его амплификации с помощью ПЦР (60 циклов): а — плазмида *pCM5018* (дорожка 1, контроль); секционный материал человека (дорожка 2); б — обработка рестриктазой *BamHI* (дорожка 1) амплификата секционного материала (дорожка 2). М — маркеры молекулярной массы

Рис. 2. Электрофореграммы фрагмента ДНК ЦМВ после его амплификации в двух последовательных ПЦР с внешними (1-я реакция) и внутренними (2-я реакция) праймерами: 1—4 — образцы секционного материала человека (4 требует дополнительной амплификации); 5 — амплификация ДНК плазмиды *pCM5018*, направляемая только внутренними праймерами; 6 — то же, что 5, но с внешними праймерами; 7 — моча новорожденного (без выделения ДНК). А — амплификация за счет внутренних и В — внешних праймеров; В — предположительно является димером А; Г — димером В; Д — предположительно возникает из амплифицированного материала после продолжительной ПЦР

числа циклов амплификации сверх 40 искомая полоса ДНК начинала исчезать и возникала новая полоса на старте гель-электрофореза, что интерпретировалось нами как участие амплифицированной ДНК (включая и неспецифические зоны) в образовании разветвленных структур в ходе гомологического спаривания.

Чтобы повысить чувствительность анализа, оставаясь в рамках одного метода, решили для тех случаев, где амплификат не выявляется окрашиванием бромистым этидием, провести его вторичную амплификацию с использованием праймеров, фланкирующих внутреннюю часть (217 н. п.) амплифицированного фрагмента. Структуры левого и правого внутренних праймеров были соответственно: 5'СAGTGTCTGAGATAGAGGAA3'; 5'ТАТТGAGTAGGATTACAGAG3'. Эксперимент проводили по следующей схеме: 40 циклов амплификации на внешних праймерах и от 20 до 70 циклов (в зависимости от итога) на внутренних.

Типичный результат представлен на рис. 2. Хорошо видны контрольные полосы амплификации ДНК из плазмиды *pCM5018* с помощью внутренних (дорожка 5, полоса А) и внешних (дорожка 6, полоса В) праймеров. Четко видны полосы А в тестируемых пробах секционного материала (дорожки 1—3) и пробе мочи новорожденного (дорожка 7). В последнем случае клиническая картина ЦМВИ была столь выраженной, что для анализа взяли пробу мочи без выделения

риала, которая показала наличие искомой полосы *A* лишь при увеличении числа циклов ПЦР на внутренних праймерах до 70 (данные не приведены).

Обращает на себя внимание присутствие дополнительных полос, видимых на снимке: полосы *B* и *G* интерпретируются нами как димерные структуры основных полос. Отметим, что эти структуры могут отражать особенности используемой нами термофильной полимеразы. Полоса *D* появляется в тех случаях, когда концентрация амплифицированного материала в реакционной смеси превышает некую допустимую величину. Выше мы это уже упоминали.

Все образцы, подвергнутые двойной ПЦР с внешними и внутренними праймерами, были верифицированы с помощью рестрикции эндонуклеазой *VamHI* (данные не приведены).

Все 12 образцов, тестированных данным методом (7 образцов секционного материала, 5 прижизненных проб), дали положительный ответ, хотя «сигнал» был различной силы: 6 секционных образцов и моча ребенка в остром периоде ЦМВИ диагностировались уже после 20 циклов вторичной ПЦР, тогда как остальные требовали 50–70 циклов.

Было решено оценить чувствительность используемого приема. С этой целью ДНК плазмиды *pCM5018* (30 мкг/мл) разбавляли от 10^5 до 10^{10} раз. Последнее соответствовало 1–5 молекулам плазмиды в пробе. При всех разбавлениях метод двойной амплификации дал положительный ответ (при отсутствии сигнала в пробе без плазмиды). Этот эксперимент позволяет сделать два вывода: 1) предлагаемый метод диагностики ЦМВ практически не имеет ограничений своей чувствительности; 2) в ряде прижизненных проб (моча беременных женщин с вялотекущим заболеванием) концентрация ЦМВ оказалась чрезвычайно низкой.

Высокая чувствительность и точность описываемого экспресс-метода даст возможность применять его для скрининга ЦМВ в популяционных исследованиях.

Авторы выражают благодарность О. К. Кабоеву за предоставление ДНК-полимеразы из *T. thermophilus*; В. М. Месянджинову — плазмиды *pCM5018*; В. В. Константинову — за синтез олигонуклеотидов.

Резюме

Описана процедура быстрого, чувствительного та точного визначення цитомегаловірусу (ЦМВ) у тканинах і біологічних рідинах людини за допомогою термофільної ДНК-полімеразі *Thermus thermophilus*. Процедура складається з двох послідовних ПЦР. У першій реакції проходить 40 циклів (денатурація ДНК, ренатурація праймерів і ДНК-полімеризація), що виконуються з двома праймерами по 20 основ, консервативна послідовність яких узятя із гену *MIE* (major immediate early) ЦМВ. Друга реакція включає від 20 до 50 циклів, що відповідають першим, але на основі 20-членних праймерів, які ампліфікують внутрішню частину фрагменту ДНК (останній намножений раніше). Кінцевий фрагмент виявляється при фарбуванні бромистим етидієм після електрофорезу в поліакриламідному гелі. Верифікація потрібної смуги провадиться і на основі рестрикційного аналізу. За допомогою плазмиди *pCM5018*, що несе ген *MIE* вірусу, показано, що пропонується процедура може виявляти такі малі кількості ДНК, як декілька (від 1 до 5) плазмідних молекул.

Summary

A rapid, sensitive and precise procedure of detecting cytomegalovirus (CMV) DNA in human tissue and biological liquid by means of the thermostable DNA-polymerase from *Thermus thermophilus* is described. The procedure consists of two consecutive PCRs. The first one includes 40 cycles of denaturation, primer annealing and chain extension with two 20-base primers chosen from the conserved sequence of *MIE* (major immediate

early) gene of CMV. The second reaction includes from 20 up to 50 cycles consisting of the same steps but with 20-base primers chosen to amplify the internal part of the fragment amplified during the first reaction. The final fragment is detected by the ethidium bromide staining after polyacrylamide gel electrophoresis. Verification of the band includes restriction enzyme analysis. Use of *pCM5018* plasmid bearing the CMV MIE gene shows that the proposed procedure can detect as little as several (from 1 to 5) molecules of DNA.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Самохин П. А. Цитомегаловирусная инфекция у детей.— М.: Медицина, 1987.— 161 с.
2. *Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia* / R. K. Saiki, St. Scharf, F. Faloona et al. // *Science*.— 1985.— 230, N 4732.— P. 1350—1354.
3. *Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification* / G. J. Demmler, G. J. Buffone, C. M. Schimbor, R. A. May // *J. Infect. Diseases*.— 1988.— 158, N 6.— P. 1177—1184.
4. *Polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus* / J. M. Li, M. A. Morgan, D. Rascon et al. // *Abstrs Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.*— New Orleans, 1989.— S-10.— P. 372.
5. *Fiss E., York M. K., Brooks G. F. Detection of cytomegalovirus in bronchial lavage and blood specimens by means of the polymerase chain reaction* // *Ibid.*— C-176.— P. 422.
6. *Forman M., Charache P., Arthur R. The use of polymerase chain reaction for detection of cytomegalovirus in clinical specimens* // *Ibid.*— D-238.— P. 122.
7. *Use of the polymerase chain reaction technique to detect cytomegalovirus* / E. Rosenberg, J. Keiser, J. Gross et al. // *Ibid.*— D-239.— P. 122.
8. *Использование цепной реакции полимеризации для выявления вируса цитомегалии в тканях человека* / Г. Р. Виноградская, И. Ю. Горышин, О. В. Плуталов и др. // VII Всесоюз. симпозиум. «Молекуляр. механизмы генет. процессов».— М., 1990.— С. 2037.
9. *Ryger R., Bornkamm G. W., Fleckenstein B. Human cytomegalovirus sequences with homologies to the cellular genome* // *J. Gen. Virol.*— 1984.— 65.— P. 1351—1364.
10. *Goetz S. E., Hamilton S. R., Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue* // *BBRC*.— 1985.— 130, N 1.— P. 118—126.
11. *Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Методы генетической инженерии. Генетика бактерий.*— М.: Мир, 1984.— 176 с.
12. *Прямозависимая амплификация двух участков β -глобинового гена человека* / Е. И. Шварц, О. К. Кабоев, А. А. Гольцов и др. // *Биоорг. химия*.— 1988.— 14, № 11.— С. 1577—1579.
13. *Stenberg R. M., Thomsen D. R., Stinski M. F. Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus* // *J. Virol.*— 1984.— 49, N 1.— P. 190—199.

Ленинград. ин-т ядер. физики им. Б. П. Константинова
АН СССР

Получено 05.07.90

Ин-т акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта АМН СССР,
Ленинград
Ин-т биоорг. химии им. М. М. Шемякина АН СССР,
Москва
Ленинград. педиатр. мед. ин-т Минздрава РСФСР

УДК 616-056.7:616.153.922

Н. Б. Должанская, М. Т. Тодорова, А. Л. Шварцман

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИСМЫСЛОВОЙ КОНСТРУКЦИИ κ ДНК РЕЦЕПТОРА ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ЧЕЛОВЕКА

Получена антисмысловая конструкция κ ДНК рецептора липопротеинов низкой плотности (рЛНП) человека. Эта конструкция включает 5'-концевой фрагмент (1,1 тыс. п. н.) κ ДНК рЛНП и промотор гена металлотиионина мыши и может быть использована для создания трансгенных животных, дефицитных по рЛНП.

© Н. Б. ДОЛЖАНСКАЯ, М. Т. ТОДОРОВА, А. Л. ШВАРЦМАН, 1991