

МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ КОРОНАВИРУСА, ВЫЗЫВАЮЩЕГО SARS, С ПОМОЩЬЮ ДВУСТАДИЙНОЙ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ, СОВМЕЩЕННОЙ С ПЦР (ОТ-ПЦР)

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на применении олигонуклеотидов, впервые описанных в Институте тропической медицины в Гамбурге, Германия (Drosten et al., N Engl J Med 2003; 348(20):1967-1976.), связывающихся с регионом POL генома коронавируса SARS.

Метод осуществляют с помощью следующих этапов:

- Этап 1 выделение РНК
- Этап 2 В одной пробирке проводят реакцию обратной транскрипции для получения комплементарной ДНК (кДНК) (этап 2а) и первый цикл ПЦР с помощью олигонуклеотидов BNIoutS2 и BNIoutAS (этап 2б), затем второй цикл ПЦР с помощью олигонуклеотидов BNIoutS и BNIoutAs (этап 2в).
- Этап 3 Анализ содержания продуктов амплификации с помощью электрофореза на агарозном геле
-

ОБЩИЕ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Образцы тканей, содержащих SARS, следует обрабатывать в соответствии с правилами биологической защиты (не менее уровня BSL2 и мерами индивидуальной защиты на уровне BSL3).

Следует использовать оборудование, не содержащее РНКазы и ДНКазы, и наконечники для пипеток с проиовоаэрозольным фильтром.

Во время работы следует постоянно пользоваться перчатками и одноразовыми костюмами.

Материал, который может быть контаминирован (образцы, контроли, ампликоны) следует хранить отдельно от остальных реагентов.

С реагентами, используемыми для приготовления амплификационной смеси и ампликонами следует работать в пространственно разделенных областях.

Методы

Этап 1 Выделение РНК вируса (проводят в области 1 «Область подготовки материала»)

Допускается применять любые методы выделения РНК, используемые в сочетании с ПЦР с обратной транскрипцией

Методику выделения РНК изменяют в соответствии с типом используемого клинического материала.

Например, для выделения РНК из материала дыхательных путей (мокроты, смывов и мазков из носо- или ротоглотки, БАЛ), сыворотки или очищенного экстракта каловых масс можно применить набор QIAamp viral RNA Mini Kit (QIAGEN).

Реагенты

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

Перед выделением РНК необходимо прогреть все реагенты и материалы до комнатной температуры.

Подготовка буфера AW1.

Перед первым использованием следует добавить к концентрату буфера AW1 достаточное количество 100% этанола в соответствии с указаниями на бутылки (буфер AW1 в закрытом состоянии при комнатной температуре сохраняет годность в течение 1 года)

Внимание! Содержит раздражающее вещество — хаотропную кислоту: необходимы соблюдение мер предосторожности, пользование перчатками, предотвращение контакта с дезинфицирующими средствами, содержащими отбеливатели

Подготовка буфера AW2

Перед первым использованием следует добавить к концентрату буфера AW1 достаточное количество 100% этанола в соответствии с указаниями на бутылки (буфер AW1 в закрытом состоянии при комнатной температуре сохраняет годность в течение 1 года)

Внимание! В качестве консерванта содержит азид натрия: азид натрия высокотоксичен и может взрываться при контакте со свинцовыми и медными водопроводными трубами; необходимо соблюдать соответствующие меры предосторожности и работать в перчатках. Следует соблюдать осторожность при работе с растворами, содержащими азид.

Добавление переносчика к буферу AVL.

Удостоверьтесь в отсутствии преципитата в буфере AVL, при необходимости подогрейте его до 80°C для растворения преципитата.

Добавьте 1 мл буфера AVL в одну пробирку, содержащую переносчик РНК. Тщательно растворите переносчик РНК. Перелейте его в бутылку с буфером AVL; перед первым использованием тщательно перемешайте буфер AVL.

Материал и контроль

- Клинический материал

В каждую серию исследований включают:

- аналогичный клинический материал, смешанный с небольшой концентрацией положительного контроля (для исключения наличия ингибиторов)
- два отрицательных контроля выделения (один в начале, и один — в конце серии)
- один положительный контроль выделения

Методика:

РНК выделяют из 140 мкл каждого образца с помощью QIAamp viral RNA Mini Kit (QIAGEN) согласно инструкциям изготовителя.

Затем РНК разводят до 60 мкл в присутствии переносчика РНК.

1. К 140 мкл клинического материала, находящегося в 1,5 мл пробирке типа erpendorf, добавляют 560 мкл буфера AVL, содержащего переносчик РНК.
2. Перемешивают
3. Инкубируют 10 минут при комнатной температуре
4. Кратковременно центрифугируют
5. Добавляют 560 мкл 100% этанола. Перемешивают Кратковременно центрифугируют
6. Осторожно добавляют 630 мкл раствора, полученного на этапе 5, в колонку QIAamp (в 2 мл пробирке). Закрывают крышку и центрифугируют при 6000 g (8000 оборотов в минуту) в течение 1 минуты. Затем помещают колонку QIAamp в чистую 2 мл пробирку и удаляют пробирку, содержащую отфильтрованную жидкость.
7. Осторожно открывают колонку QIAamp и повторяют этап 6.
8. Осторожно открывают колонку QIAamp и добавляют в нее 500 мкл буфера AW1. Закрывают крышку и центрифугируют при 6000 g (8000 оборотов в минуту) в течение 1 минуты. Затем помещают колонку QIAamp в чистую 2 мл пробирку (поставляется в комплекте) и удаляют пробирку, содержащую отфильтрованную жидкость.
9. Осторожно открывают колонку QIAamp и добавляют в нее 500 мкл буфера AWS2. Закрывают крышку и центрифугируют на полной скорости (20 000 g, 14 000 оборотов в минуту) в течение 3 минут. Помещают колонку в новую 2 мл пробирку (в комплекте не поставляется) и удаляют пробирку, содержащую отфильтрованную жидкость. Центрифугируют на полной скорости (20 000 g, 14 000 оборотов в минуту) в течение 1 минуты.
10. Помещают колонку QIAamp в чистую 1,5 мл пробирку для микроцентрифугирования (в комплекте не поставляется). Удаляют старую пробирку, содержащую отфильтрованную жидкость. Осторожно открывают колонку QIAamp и добавляют 60 мкл буфера AVE, подогретого до комнатной температуры. Закрывают крышку и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 минуты. Затем центрифугируют при 6000 g (8000 оборотов в минуту) в течение 1 минуты.
11. Выбрасывают колонку; РНК хранят при температуре –20°C или –70°C.

Этап 2 Двустадийная ОТ-ПЦР "BNIout-BNIin"

Этап 2 (а, б) Первая ОТ-ПЦР « BNIout »

(проводят в области 2 «Область подготовки смеси для ПЦР»)

Реагенты

ОТ-ПЦР проводят в одной пробирке с помощью набора Invitrogen « Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq ». Аналогичные результаты (с поправкой на различные условия эксперимента) можно получить с помощью других наборов, например, « Titan » фирмы Roche Boehringer.

Ингибитор РНКазы

RNAasin (N2511/N2515), фирма Promega

Олигонуклеотиды

PROLIGO (quality Oligo Fast или guaranteed oligos)

- BNIoutS2 (прямой) : 5' ATg AAT TAC CAA gTC AAT ggT TAC 3'

- BNIoutAs (обратный) : 5' CAT AAC CAg TCg gTA CAg CTA C 3'

Ожидаемый размер ампликона: 190 pb

РНК для положительного контроля:

Синтетические транскрипты РНК (Rout) 960nt в длину, содержащие последовательность ампликона BNIout (190 nt). Для определения чувствительности исследования рекомендуется применять синтетический транскрипт РНК в количестве 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 копий.

Синтетическая РНК поставляется в виде замороженного раствора в концентрации 1 нг/мл (то есть $1,8 \times 10^9$ молекул на мл); содержание дрожжевой тРНК составляет 100 нг/мл.

Перед использованием следует развести ее в отношении 1 : 900 (то есть до 2×10^6 молекул/мл), затем приготовить серию разведений от 10^{-1} to 10^{-7} на воде (градуированная ПЦР). Для реакций используют по 5 мкл соответствующего разведения. Разведения от 10^{-3} до 10^{-7} соответствуют от 10 000 до 1 копии РНК в 5 мкл.

Материал и контроль

Одновременно ставят реакцию со следующими образцами.

РНК из:

- клинического материала
- 2 отрицательных контролей выделения РНК
- положительный контроль выделения РНК

Кроме того, в реакцию включают

- 2 отрицательных контроля для первого цикла ПЦР
- 4 положительных контроля для амплификации, содержащие соответственно 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 копий синтетического транскрипта РНК (Rout)

Методика:

1. Приготовьте следующую смесь для реакции:

H ₂ O	6,5 мкл
Реакционная смесь, 2-х	12,5 мкл
Oligo BNIoutS2 50 мкмоль	0,2 мкл
Oligo BNIoutS2 50 мкмоль	0,2 мкл
RNA _{in} 40 МЕ/мкл	0,12 мкл
смесь RT/Platinum Taq	0,5 мкл

2. К 20 мкл смеси реагентов добавьте 5 мкл полученной РНК и проведите амплификацию в термоциклере (условия реакции приводятся для термоциклера ABI 9600, для других термоциклеров их следует подобрать дополнительно).

2.1 45°C 30 мин

55°C 15 мин

94°C 2 мин

2.2.	94°C	15 сек	5 циклов
	45°C	30 сек	
	72°C	30 сек	

2.3.	94°C	15 сек	35 циклов
	55°C	30 сек	
	72°C	30 сек + 2 сек на цикл	

2.4. 72°C 5 мин

2.5 10°C ∞

Консервация при +4°C.

Этап 2в: вторая двустадийная ОТ-ПЦР «BNIn»

(проводят в области 2Б «Область подготовки смеси для ПЦР»)

Материал и контроль

Одновременно ставят реакцию со следующими образцами.

Продукт первой амплификации ПЦР для следующих образцов:

- клинического материала
- 2 отрицательных контроля выделения РНК
- положительный контроль выделения РНК
- 2 отрицательных контроля для первого цикла ПЦР
- 4 положительных контроля для амплификации, содержащие соответственно 10⁴, 10³, 10², 10¹ копий синтетического транскрипта РНК (Rout)

Кроме того, в реакцию включают

- 2 отрицательных контроля для первого цикла ПЦР

Реагенты

Набор AmpliTaq DNA Pol фирмы Applied Biosystems (буфер 10-х, и не содержащий $MgCl_2$, номер по каталогу 27216601).

$MgCl_2$: 25 ммоль

смесь dNTP: 5 ммоль

Олигонуклеотиды

PROLIGO (quality Oligo Fast или guaranteed oligos)

- BNIinS (прямой) : 5' gAA gCT ATT CgT CAC gTT Cg 3'

- BNIoutAs (обратный) : 5' CTg TAg AAA ATC CTA gCT ggA g 3'

Ожидаемый размер ампликона: 109 pb

Методика:

1. Приготовьте следующую смесь для реакции:

H ₂ O	35,8 мкл
Буфер Taq, 10-х	5 мкл
$MgCl_2$ 25 ммоль	4 мкл
Смесь dNTPs 5 ммоль	2 мкл
Oligo BNIoutS2 50 ммоль	0,5 мкл
Oligo BNIoutS2 50 ммоль	0,5 мкл
Taq ADN pol 5 МЕ/мкл	0,25 мкл

2. К 48 мкл смеси для реакции добавляют 2 мкл продукта первой амплификации ПЦР и проводят амплификацию (приведены условия реакции для аппарата ABI 9600):

2.1. 94°C 2 мин

2.2.	94°C	30 сек		
	50°C	45 сек		× 5 циклов
	72°C	30 сек		

2.3.	94°C	30 сек		
	55°C	30 сек		× 35 циклов
	72°C	30 сек + 1 сек на цикл		

2.4. 72°C 5 мин

2.5. 10°C ∞

Этап 3 Анализ продуктов реакции амплификации (проводят в области 3 «Область обработки амплифицированного материала»)

Проводят анализ 10 мкл продуктов, полученных при первом и втором циклах амплификации, на 3% агарозном геле « low-melting » (типа Seakem GTG).

Реагенты

Буфер ТАЕ 50X, концентрированный в 6 раз: (на 1 л)

Основание Tris	240 г
Уксусная кислота	57,2 мл
ЭДТА 0,5 моль	100 мл
H ₂ O	до 1 л

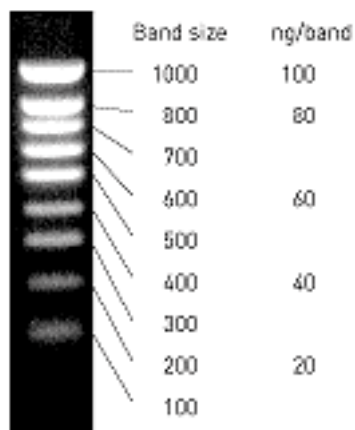
10% этидия бромид (**Внимание!** Этидия бромид – **канцероген**. Необходимо пользоваться перчатками, а в случае контакта с кожей промыть ее достаточно большим количеством воды; все реагенты, содержащие этидия бромид, следует утилизировать с помощью соответствующих методов дезактивации).

Красящий раствор, концентрированный в 6 раз:

бромифеноловый голубой	1 мг/мл
цианол ксилола FF	1 мг/мл
глицерин	30%

Легкоплавкая агароза Seakem (GTG)

Маркер молекулярной массы: SmartLadder SF (Eurogentec)



http://www.eurogentec.com/code/en/page_08.asp?Page=354&smenu=5#A2

Методика:

Для приготовления большого количества агарозного геля

1. в коническую колбу налить 100 мл разведенного буфера TAE
2. добавить 3 мл легкоплавкой агарозы Seakem и перемешать, осторожно взбалтывая
3. Растворить в микроволновой печи (с осторожностью, поскольку образуется большое количество дыма)
4. добавить 6 мкл 1% раствора этидия бромиды
5. перемешать, осторожно взбалтывая
6. вылить раствор в заливочный столик, избегая образования пузырьков
7. установить гребенку и оставить гель загустевать.
8. поместить заливочный столик в электрофоретическую камеру и добавить разведенный буфер TAE, чтобы он покрывал поверхность геля
9. удалить гребенку
10. загрузить по 10 мкл каждого образца и по 1,5 мкл красящего раствора
11. одновременно загрузить маркер молекулярного веса
12. провести электрофорез под напряжением 5 В/см
13. остановить электрофорез, когда краситель бромфеноловый голубой достигнет 2/3 геля
14. Визуализировать ДНК с помощью ультрафиолетового облучения

В большинстве случаев чувствительность двустадийной ОТ-ПЦР составляет менее 10 копий РНК, а первой « BNIout » ПЦР — в пределах 10^4 копий.

Аmplificицированные фрагменты можно очистить с помощью набора для ПЦР QIAquick (QIAGEN) и секвенируют с олигонуклеотидами BNIinS и BNIinAs в качестве праймеров.

В Институте Пастера разработаны альтернативные методики двустадийной ОТ-ПЦР, чувствительность которых аналогичная.

Двустадийная ОТ-ПЦР с праймерами SNE/SAR для выявления области « CDC » гена POL в геноме вируса SARS-CoV с помощью праймеров SNE, полученных из праймеров, впервые описанных CDC для первого этап двустадийной ПЦР и праймеров SAR, впервые описанных в институте Бернхарда Нохта (Bernhard Nocht) для второго этап двустадийной ПЦР.

Двустадийная ОТ- ПЦР N-IP разработана в институте Пастера и выявляет ген N в геноме вируса SARS-CoV.

Далее будет проведено их сравнение с двустадийной ОТ-ПЦР с праймером BNI.

По поводу двустадийной ОТ-ПЦР обращайтесь в институт Пастера.

Доктор Sylvie van der WERF, svdwerf@pasteur.fr

Доктор Nicolas ESCRIOU, escrion@pasteur.fr