



УДК 577.113.6 : 578.833.2

© 1994 Т. С. Годовикова, Т. Н. Орлова, Е. Ю. Добрикова, В. А. Шаманин, В. Ф. Зарытова, Н. В. Воробьева*, Н. А. Сердюкова*, М. Ю. Шаманина*, И. О. Петрусева*, Н. Д. Пищенко**

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ НЕРАДИОАКТИВНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН;

** Новосибирский институт цитологии и генетики СО РАН;*

*** Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций*

Ключевые слова: обратная дот-гибридизация; вирус клещевого энцефалита; нерадиоактивная детекция; полимеразная цепная реакция; мембраны лавсановые; олигонуклеотиды, иммобилизация.

Для детекции РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в клинических образцах разработан нерадиоактивный метод гибридизационного анализа. Метод включает в себя реакцию обратной транскрипции (ОТ) и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с биотинилированными праймерами, соответствующими консервативной области генома, кодирующей белок Е вирусной оболочки.

Показано, что выбранные праймеры с высокой эффективностью и специфичностью инициируют реакции полимеризации с РНК 28 исследованных штаммов ВКЭ.

Для выявления биотинмеченого продукта ПЦР обратной дот-гибридизацией впервые использованы лавсановые мембраны с иммобилизованными олигонуклеотидами, комплементарными амплифицированному фрагменту. Чувствительность разработанного метода с использованием нерадиоактивной детектирующей системы стрептавидин—пероксидаза сопоставима с чувствительностью дот-гибридизационного анализа продукта ПЦР с помощью ^{32}P -ДНК-зонда на капроне и составляет 10^3 — 10^4 молекул вирусной РНК. Метод апробирован для детекции РНК ВКЭ в индивидуальных клещах и крови людей.

Клещевой энцефалит — тяжелая нейровирусная инфекция, переносимая клещами. Рост заболеваемости КЭ в регионах Сибири и Дальнего Востока диктует острую необходимость разработки экспресс-методов для индикации вируса клещевого энцефалита.

Принятые сокращения: КЭ — клещевой энцефалит, ВКЭ — вирус клещевого энцефалита, ОТ — обратная транскрипция, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ШЭО — Шотландский энцефаломиелит овец, ОГЛ — Омская геморрагическая лихорадка, КЛБ — Киасанурская лесная болезнь.



Рис. 1. Нуклеотидная последовательность фрагментов участков геномов, кодирующих белок оболочки Е для штаммов Софьин (1) и № 205 (2, показаны только различающиеся нуклеотиды); звездочками отмечена локализация праймеров P1, R1, ломаной линией — локализация праймеров P2, R2. Подчеркнуты олигонуклеотиды, ковалентно присоединяемые к лавсану

В последние годы в диагностике КЭ получили распространение методы, основанные на иммунологическом принципе взаимодействия антиген—антитело. Однако чувствительности их часто недостаточно для прямой детекции ВКЭ в исследуемом материале, поэтому требуется предварительное накопление вируса в биологической системе, что, несомненно, увеличивает длительность анализа [1].

Иммуноферментный анализ — наиболее быстрый и чувствительный, но вместе с тем и многофакторный метод. Следствием последнего является неспецифический характер взаимодействия компонентов тест-системы с клиническим материалом. Существенный недостаток в случае обнаружения антигена в клиническом материале — возможность получения ложноположительных результатов за счет перекрестных взаимодействий, а также взаимодействия детектирующих антител с ревматоидным фактором [2] или с антиидиотипическими антителами, вырабатываемыми в организме, согласно теории N. Jerne [3], в ответ на специфические антитела против возбудителя инфекции. Ситуация осложняется еще и наличием феномена «серонегативности», который характеризуется отсутствием специфических антител в периферической крови больных с клиническими признаками КЭ [4].

Установление нуклеотидной последовательности генома ВКЭ [5] стимулировало создание принципиально новых подходов для индикации ВКЭ, а именно выявление вирусного генетического материала методом дот-гибридизации с использованием ³²P-меченого ДНК-зонда [6]. Этот метод позволяет выявлять около 10⁶ молекул РНК ВКЭ, что соответствует 10 пг вирусной РНК. Однако он не нашел широкого применения в клинике, что связано с нестабильностью метки и радиационной опасностью при работе с ней.

Настоящее сообщение посвящено созданию высокочувствительного нерадиоактивного экспресс-метода для выявления РНК ВКЭ в биологических образцах. Метод включает в себя:

1) синтез кДНК с использованием биотинилированного праймера P1, комплементарного «плюс»-цепи РНК ВКЭ в положении 1308—1289 с 5'-конца, и ревертазы из *E. coli* или фрагмента Кленова;

2) амплификацию с помощью термостабильной ДНК-полимеразы участка кДНК, фланкируемого биотинилированными праймерами P1 и R1 (структура последнего гомологична «плюс»-цепи РНК ВКЭ в положении 1199—1218 с 5'-конца);

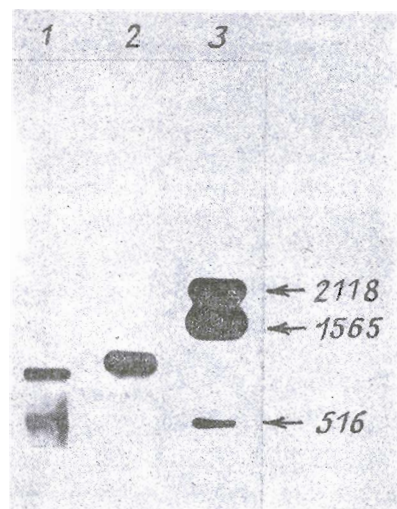


Рис. 2. Авторадиография результатов блот-гибридизации с ^{32}P -меченым вирусспецифическим зондом продуктов обратной транскрипции РНК ВКЭ с праймерами *P1* (дорожка 1), *P2* (2), маркер (3, приведен размер в п. о.)

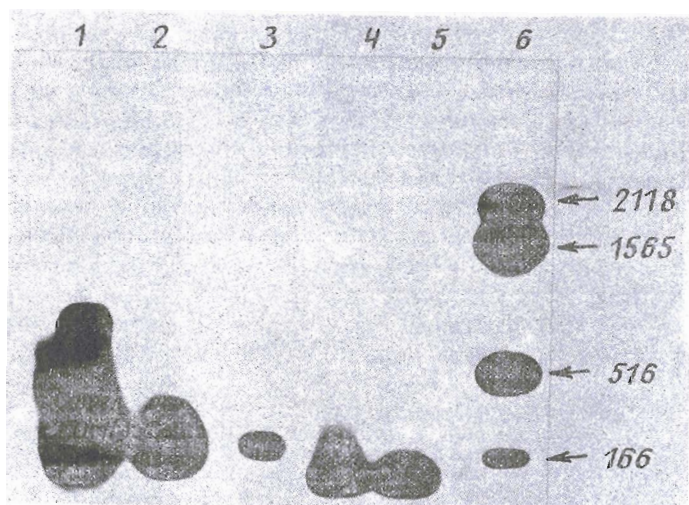


Рис. 3. Авторадиография результатов блот-гибридизации с ^{32}P -меченым вирусспецифическим зондом рТВЕ 51.1 продуктов реакции ОТ-ПЦР с праймерами *P2/R2* и РНК ВКЭ в количестве 1 (1), $1 \cdot 10^{-2}$ (2), $1 \cdot 10^{-4}$ нг (3); с праймерами *P1/R1* и РНК ВКЭ в количестве 1 нг (4); с биотинилированными праймерами *P1/R1* и РНК ВКЭ в количестве 1 нг (5). 6 — маркеры (приведен размер в п. о.)

3) гибридизацию двухцепочечного биотинилированного амплифицированного фрагмента кДНК ВКЭ с 20-звенными олигонуклеотидными зондами (комплементарными «плюс»- или «минус»-цепям РНК ВКЭ в положениях 1286—1267 и 1219—1238 с 5'-концов соответственно), ковалентно присоединенными к лавсановой мембране;

роксидаза.

Разработанный метод позволяет детектировать 10^3 -- 10^4 молекул исходной РНК ВКЭ.

При выборе праймеров, инициирующих реакции обратной транскрипции и ПЦР, для диагностики широкого спектра штаммов ВКЭ основным требованием является их локализация в наиболее консервативных участках вирусного генома.

По данным А. Г. Плетнева и сотр. [7], высокая степень гомологии характерна для структуры белка Е оболочки, особенно внутри одной серологической подгруппы вирусов. Для представителей флавивирусов различных подгрупп она значительно меньше [7]. Сравнение первичных структур участков геномов, кодирующих белок Е, для двух штаммов ВКЭ (Софьин и № 205) также обнаруживает значительную гомологию. Исходя из этого, в данной области генома были выбраны два набора праймеров, инициирующих реакцию обратной транскрипции и ПЦР (рис. 1). Праймеры *P1*, *R1* соответствуют районам с полной гомологией нуклеотидных последовательностей двух штаммов. Гомологию в районе локализации праймера *P2* нарушает точечная замена С на U. Известно, что пара G·T — одна из самых стабильных неканонических пар [8], что позволяет надеяться на образование комплементарного матрично-затравочного комплекса, достаточно прочного для эффективного протекания реакции полимеризации.

Условия реакций полимеризации с выбранными праймерами подробно изложены в «Экспериментальной части». В качестве матрицы была использована РНК ВКЭ высокопатогенного штамма Софьин в составе суммарной РНК, выделенной из мозга инфицированных мышей (содержание РНК ВКЭ составляло 0,1%).

Эффективность и специфичность реакций полимеризации были определены путем выявления кДНК ВКЭ или ее амплифицированного фрагмента блот-гибридизацией с 32 P-вируспецифическим зондом после электрофоретического разделения продуктов реакций.

На рис. 2 представлена автордиограмма результатов анализа продуктов реакции обратной транскрипции, осуществленной с помощью праймеров *P1* и *P2* (дорожки 1, 2) и обратной транскриптазы из *E. coli*. Аналогичные результаты наблюдались при использовании фрагмента Кленова, который, как известно, способен считывать гетерополимерную РНК [9, 10]. Применение в качестве праймера олигонуклеотида *P1* приводит к накоплению единственного продукта ожидаемого размера (около 1280 нуклеотидных звеньев). Появление низкомолекулярных продуктов при использовании праймера *P2* может быть обусловлено либо деградацией матрицы, либо ее структурированностью.

Успешный синтез кДНК позволил перейти к испытанию выбранных олигонуклеотидов на праймерную активность в ПЦР. На рис. 3 приведен радиоавтограф результатов блот-гибридизационного анализа продуктов, образующихся в ходе ПЦР. При использовании праймеров *P1/R1* наблюдается высокоэффективный специфичный синтез ожидаемого продукта в 109 нуклеотидных звеньев при использовании как небiotинилированных (дорожка 4), так и биотинилированных праймеров (дорожка 5).

При использовании праймеров *P2/R2* в образцах с высокой концентрацией РНК появляются продукты ПЦР, соответствующие по подвижности не только целевому продукту размером 167 нуклеотидных звеньев, но и фрагменту ДНК длиной 900 нуклеотидных звеньев. Анализ структуры РНК, проведенный по методу [11], показал высокую гомологию 3'-конца праймера *R2* области 372—381 РНК-матрицы, которая может обуславливать появление дополнительного продукта. С уменьшением концентрации матрицы выход 900-звенного фрагмента снижается.

Таким образом, большая селективность при образовании матрично-затравочного комплекса достигается при использовании олигонуклеотидов *P1/R1*, поэтому дальнейшие исследования были проведены с этой парой праймеров.

Для оценки универсальности выбранных праймеров они были испытаны на

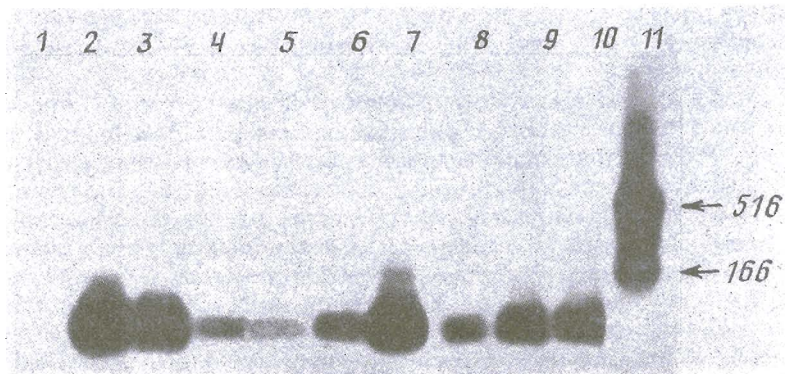


Рис. 4. Авторадиография результатов блот-гибридизации с ^{32}P -меченым вирусспецифическим зондом продуктов реакции ОТ-ПЦР с праймерами P1/R1 и РНК ВКЭ в составе суммарной РНК, выделенной из мозга мышей, инфицированных различными штаммами ВКЭ: Софьин (2), 205 (3), Тамари-1 (4), Приморье-2 (5), Тенис-4 (6), 4072 (7), Волхов-2 (8), Сестрорецк-2 (9), Абсеттаров (10). Контроль — 1 мкг суммарной РНК из мозга неинфицированных мышей (1). 11 — маркер (размер в п. о.)

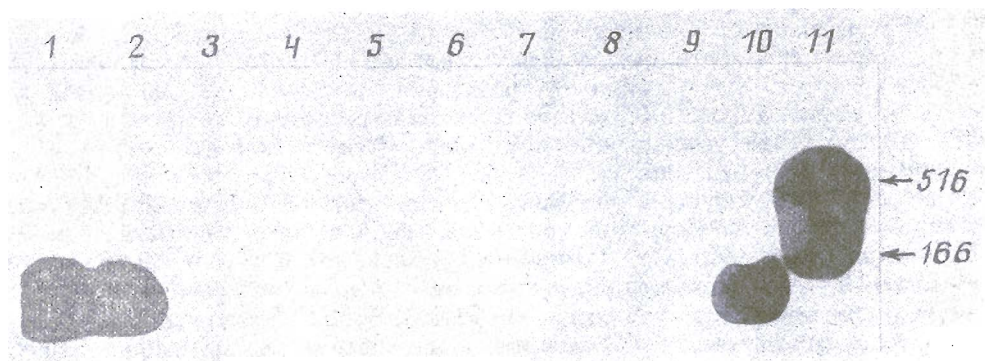


Рис. 5. Авторадиография результатов блот-гибридизации с ^{32}P -меченым вирусспецифическим зондом продуктов реакции ОТ-ПЦР с праймерами P1/R1 и суммарной РНК, выделенной из мозга мышей, инфицированных различными флавивирусами: Нэгиши (1), ШЭО (2), ОГЛ (3), КЛБ (4), Лангат ТП-21 (5), Спаница (6), Японский энцефалит (7), Дэнге (8), Зап. Нил (9), Софьин (10). 11 — маркер (размер в п. о.)

способность инициировать реакцию обратной транскрипции и ПЦР с РНК 28 различных штаммов ВКЭ. На рис. 4 приведена авторадиография результатов блот-гибридизации ^{32}P -вирусспецифического зонда с амплифицированными фрагментами кДНК с РНК некоторых штаммов ВКЭ. Все остальные исследованные штаммы также выявляются данным тестом. В качестве отрицательного контроля была использована РНК, выделенная из мозга незараженных мышей. Полученные данные позволяют говорить о достаточной универсальности выбранных праймеров.

Критерием надежности метода наряду с универсальностью является его специфичность. Для выявления специфичности праймеров были проведены реакции обратной транскрипции и ПЦР с РНК различных флавивирусов. Продукты ПЦР были проанализированы блот-гибридизацией с ^{32}P -вирусспецифическим зондом (рис. 5). Синтез продуктов ПЦР наблюдался при использовании в качестве матриц РНК эталонного штамма Софьин и РНК двух вирусов, относящихся к комплексу КЭ — Нэгиши и ШЭО. Наличие продуктов ПЦР у вирусов Нэгиши и ШЭО объясняется тесным генетическим родством с вирусом КЭ, которое проявляется и при других методах тестирования [12]. У остальных испытанных

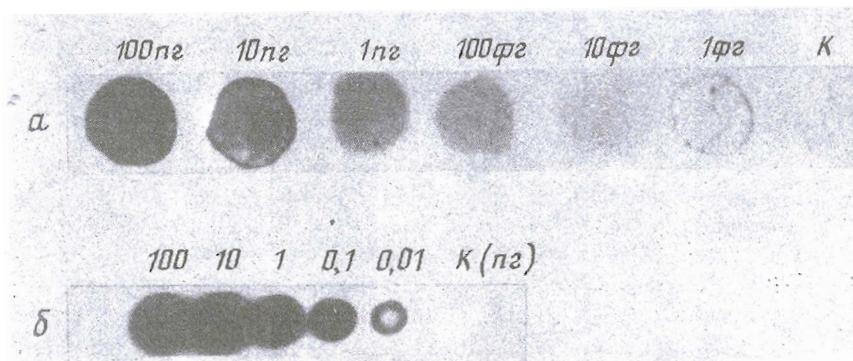


Рис. 6. Результаты анализа продуктов реакции ОТ-ПЦР с биотинилированными праймерами P1/R1 и разными количествами РНК ВКЭ штамма Софьин обратной дот-гибридизацией на аффинной лавсановой подложке (а) и дот-гибридизацией на капроне (б). Количество вирусной РНК в образце приведено над детектируемым пятном. Каждый образец содержал равное количество суммарной РНК, выделенной из мозга неинфицированных мышей (1 мкг). Биотининовые остатки выявляли конъюгатом стрептавидин—пероксидаза, дот-гибридизацию проводили с ^{32}P -меченым вирусспецифическим зондом. К — 1 мкг суммарной РНК из мозга неинфицированных мышей

вирусов комплекса КЭ и более дальних флавивирусов гибридизующиеся продукты ПЦР отсутствуют. Вследствие географической удаленности мест выделения вирусов ШЭО и Нэгиши (Шотландия и Япония соответственно) вероятность перекрестных реакций с ними мала, что обуславливает надежность метода.

Полученные результаты позволили перейти к следующему этапу исследования — выявлению амплифицированного фрагмента методом обратной дот-гибридизации.

Введение биотина в процессе ПЦР позволяет детектировать наработанный меченый продукт после его отделения от непрореагировавших праймеров. Для этого был использован предложенный R. K. Saiki и соавт. [13] обратный дот-гибридизационный анализ, который предполагает гибридизацию меченого продукта ПЦР с олигонуклеотидами, ковалентно присоединенными к твердой фазе.

Для проведения массовых испытаний наиболее подходящей твердой фазой являются аффинные мембраны, позволяющие одновременно в одних и тех же условиях анализировать большое число образцов.

Ранее нами был разработан способ ковалентного присоединения олигонуклеотидов к лавсану [14]. Имобилизованные олигонуклеотиды сохраняют способность к образованию прочных комплементарных комплексов в соотношении 1:1, и полученные аффинные мембраны характеризуются высокой сорбционной емкостью ($1 \cdot 10^{-10}$ моль/см 2).

В настоящей работе впервые аффинные лавсановые мембраны были использованы для выявления РНК ВКЭ. Для этого олигонуклеотиды, комплементарные внутренним областям амплифицированного фрагмента (рис. 1), были ковалентно присоединены к лавсановым мембранам.

Для определения предела детекции образцы, содержащие РНК ВКЭ штамма Софьин от 1 фг до 100 пг, приготовленные последовательным 10-кратным разведением 0,004% раствором суммарной РНК из мозга неинфицированных мышей, подвергали реакции обратной транскрипции и ПЦР с биотинилированными праймерами. Полученные биотинмеченые амплифицированные фрагменты гибридизовали с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на лавсане. Условия проведения обратной дот-гибридизации описаны в «Экспериментальной части». Для сравнения эффективности выявления амплифицированного фрагмента олиго- и полинуклеотидными зондами параллельно был поставлен анализ дот-гибридизацией на капроновых мембранах с ^{32}P -меченым вирусспецифическим зондом. Результаты (рис. 6) демонстрируют, что минимальный предел детекции

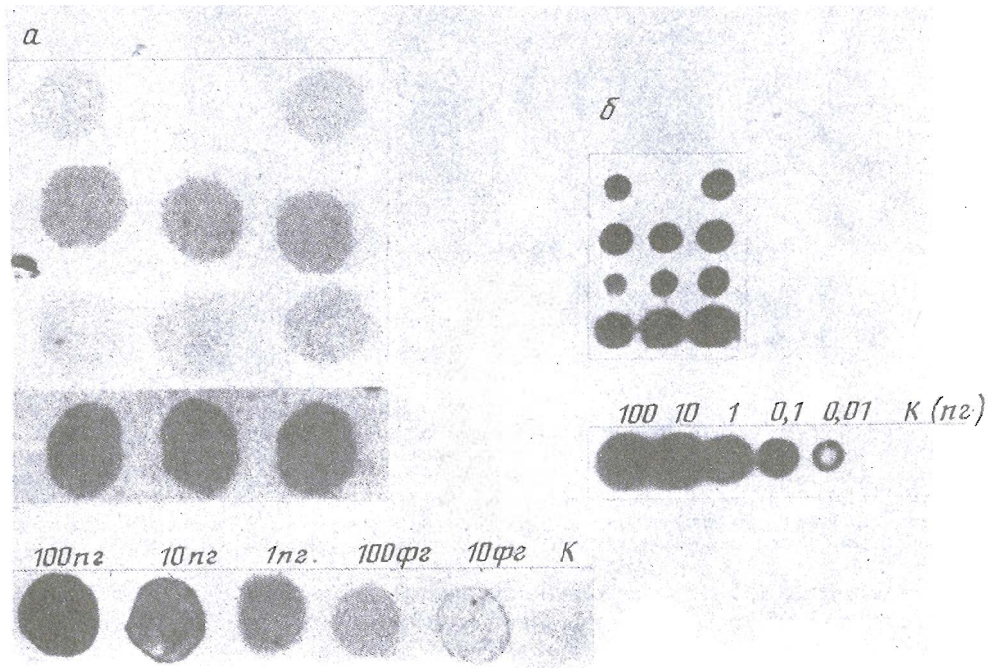


Рис. 7. Сравнительные результаты типичного анализа РНК ВКЭ в индивидуальных клещах обратной дот-гибридизацией на аффинной лавсановой мембране (а) и дот-гибридизацией на капроне с ^{32}P -меченым вирусспецифическим зондом (б). Приведены результаты анализа продуктов, полученных при исследовании 12 индивидуальных клещей (вверху) и стандартных разведений РНК ВКЭ (внизу). К — 1 мкг суммарной РНК из мозга неинфицированных мышей

РНК ВКЭ в материалах от экспериментальных животных при гибридизации биотинилированного продукта ПЦР (с 25 циклами) на аффинных лавсановых мембранах сопоставим с чувствительностью выявления продукта ПЦР с помощью ^{32}P -ДНК-зонда и составляет около 0,1 пг вирусной РНК. Это свидетельствует о пригодности аффинных лавсановых мембран для нерадиоактивной детекции биотинмеченых продуктов ПЦР и позволяет перейти к исследованию клинических образцов.

Разработанный метод был апробирован для анализа 111 образцов РНК, выделенной из клещей, снятых с людей после укуса. Параллельно полученные продукты ПЦР детектировали дот-гибридизацией на капроне с ^{32}P -вирусспецифическим зондом. На рис. 7 представлены типичные результаты анализов, которые свидетельствуют о том, что иммобилизованные олигонуклеотидные зонды и вирусспецифический зонд длиной в 2000 нуклеотидов выявляют амплифицированные фрагменты, полученные с РНК разных клещевых изолятов, с равной эффективностью. На последнюю, таким образом, в подобранных условиях проведения обратной дот-гибридизации не влияют возможные точечные замены в выбранной для амплификации области генома.

Методом обратной дот-гибридизации были также проанализированы 30 образцов РНК из крови людей с клиническим диагнозом КЭ (клинический диагноз подтвержден результатами серологического исследования в реакции торможения геммагглютинации). РНК ВКЭ была выявлена в 93% образцов. При анализе 50 препаратов суммарной РНК из крови людей, проживающих в эндемичных по

КЭ районах (Омск), была показана высокая специфичность разработанного метода: ни в одной из проб РНК ВКЭ не была обнаружена.

Таким образом, испытания на клещах и образцах крови продемонстрировали пригодность разработанного метода для быстрой, высокочувствительной, специфичной диагностики РНК ВКЭ и возможность внедрения его в клинику.

Экспериментальная часть

В работе использовали агарозу, бромфеноловый синий (Sigma, США), нитроцеллюлозные фильтры BA-85 (Schleicher und Schüll, ФРГ), капроновые мембраны (Zeta-probe, Bio-Rad), додецилсульфат натрия, ксиленианол (Serva, ФРГ), трис(гидрокси метиламино)метан (Merck, ФРГ), 2-(4-гидрокси фенилазо)бензойную кислоту, ДНК спермы лосося (НПО «Биолар», Олайне), Полисил-СА, сефалекс G-50 (Pharmacia, Швеция), dNTP (НИКТИ БАВ, Бердск), термостабильную ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus*, фрагмент Кленова («Биопол», Москва), термостабильную ДНК-полимеразу из *T. thermophilus* («Сибэнзим», Новосибирск), конъюгат стрептавидин—пероксидаза («БиоСан», Новосибирск). Ревертаза из *E. coli* получена по разработанному ранее методу [15] и охарактеризована в работе [16].

В работе использовались буферы: 0,5 М NaCl, 0,1 М трис-HCl (pH 7,5), 0,05% Tween 20 (A); 1 М NaCl, 0,05 М трис-HCl (pH 7,5), 100 мкг/мл ДНК спермы лосося (B); 1% желатин, 0,2% казеин в буфере A (B).

Дезоксиолигонуклеотиды любезно предоставлены В. В. Горном и Т. В. Абрамовой. 5'-Фосфамиды олигонуклеотидов получали по методу, описанному ранее [15]. В качестве аминоспейсера использовали 1,2-бис(3-аминопропиламино)этан (Fluka, ФРГ).

В работе использовали эталонные штаммы вируса КЭ: Софьин, № 205, № 4072, Абсеттаров, 28 штаммов вируса КЭ, которые были выделены в Омском НИИПИ из клещей, крови больных КЭ с острыми и хроническими формами заболевания и типированы с помощью реакции торможения геммагглютинации [18]. Флавивирусы: Нэгиши, Шотландский энцефаломиелит овец (ШЭО), Омская геморрагическая лихорадка (ОГЛ), Киасанурская лесная болезнь (КЛБ), Лангат TP-21, Спалица, Японский энцефалит, Дэнге, Западный Нил — получены из Государственной коллекции вирусов при Институте вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР (Москва).

Суммарную РНК из мозга мышей и исследуемые пробы выделяли путем фенольной депротенинизации в сочетании с экстракцией хлороформом [19]. РНК хранили в виде суспензии в 70% этаноле при -70°C . Концентрацию РНК в растворе определяли спектрофотометрически, считая $1 \text{ OE}_{260} = 40 \text{ мкг РНК}$; содержание вирусной РНК определяли по [6].

Аффинные мембраны для проведения гибридизационного анализа получали в результате взаимодействия аминогруппы спейсера, предварительно введенного по 5'-концевому фосфату олигонуклеотида, с хлорангидридом остатка терефталевой кислоты. Последний получен активацией концевых карбоксильных групп лавсана пентахлоридом фосфора [14]. Лавсановые мембраны с диаметром пор 0,07 мкм были охарактеризованы и любезно предоставлены Б. В. Мчедlishвили (Институт кристаллографии, Москва).

Синтез биотинмеченых олигонуклеотидов. 5'-Фосфамид олигонуклеотида в количестве $3 \cdot 10^{-8}$ — 10^{-7} моль растворяли в 50 мкл 0,1 М боратного буфера, pH 9,2, добавляли $1 \cdot 10^{-6}$ моль 4-сульфо-3-нитрофенилового эфира биотина. Реакцию проводили 1 ч при комнатной температуре. Продукт реакции осаждали 2% раствором LiClO_4 в ацетоне и хроматографировали на колонке ($4,6 \times 250 \text{ мм}$) со смолой Lichrosorb RP-18 (10 мкм), используя градиент концентрации ацетонитрила от 0 до 20% в 0,05 М LiClO_4 . Продукт хранили при -10°C . Содержание биотина в продукте оценивали с помощью комплекса стрептавидин—2-(4'-гид-

роксифенилазо)бензойная кислота [20]. Стехиометрия присоединения биотина к олигонуклеотиду 1 : 1.

Синтез κДНК. 1 мкг исследуемой суммарной РНК растворяли в 20 мкл 0,05 М КСl с 1 мкг соответствующего олигонуклеотидного праймера, выдерживали 3 мин при 95° С, затем 15 мин при 42° С. Добавляли 5 мкл реакционной смеси, содержащей 0,15 М трис-НСl (рН 8,1), 2,5 мМ МпСl₂, 0,5 мМ раствор каждого dNTP, и 5—10 ед. акт. ревертазы из *E. coli* или фрагмента Кленова. Реакцию проводили 30 мин при 42° С. Продукты обратной транскрипции детектировали блот-гибридизацией с ³²Р-меченым вирусспецифическим зондом, как описано в работе [21].

В качестве вирусспецифического зонда использовали рекомбинантную плазмиду рТВЕ-51.1, содержащую фрагмент генома ВКЭ размером 2000 пар оснований, кодирующий область структурных генов. Введение ³²Р-метки в зонд осуществляли ник-трансляцией, используя [α-³²Р]dТТР или [α-³²Р]dАТР до удельной активности 10⁸—10⁹ имп/мин на 1 мкг ДНК [22]. В качестве маркера использовали совместный гидролизат рВВ 322/РSТI и *EcoRI* (фрагменты длиной 2118, 1565, 516, 166 п. о.), который визуализировали радиоавтографией после гибридизации с ³²Р-меченой плазмидой рТВЕ-51.1.

Полимеразная цепная реакция. К 25 мкл реакционной смеси после реакции обратной транскрипции добавляли 1 мкг соответствующего олигонуклеотидного праймера в 3 мкл Н₂О и 22 мкл раствора следующего состава: 1 мМ раствор каждого dNTP, 0,5 мМ МпСl₂, 0,15 М трис-НСl (рН 8,6), 0,008 М дитиотреит, 0,08 М КСl, 0,33 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,02% Tween 20. Реакционную смесь выдерживали 3 мин при 95° С, охлаждали до 55° С, вносили термостабильную ДНК-полимеразу (2—5 ед. акт.) и осуществляли ПЦР в следующем режиме: 95° С — 0,6 мин; 55° С — 1 мин; 70° С — 2 мин, 25—30 циклов. Продукты ПЦР детектировали обратной дот-гибридизацией на аффинных лавсановых мембранах и блот-гибридизацией с ³²Р-меченым вирусспецифическим зондом.

Обратная дот-гибридизация. Аффинные лавсановые мембраны предгибридизовали в 1 мл буфера В 40 мин при 53° С и переносили на смоченную буфером В фильтровальную бумагу. Реакционную смесь после ПЦР (7 мкл) денатурировали 3 мин при 95° С в 0,2 М NaOH, нейтрализовали равным объемом 1 М трис-НСl (рН 7,5) и наносили по 2 мкл на мембрану. Гибридизацию вели 7 мин при 53° С. После промывок буфером А дважды по 5 мин и дважды по 15 мин подложку инкубировали в буфере В 40 мин при комнатной температуре и добавляли 2 мкл конъюгата стрептавидин—пероксидаза (4 мг/мл). Реакцию проводили 15 мин, несвязавшийся конъюгат отмывали буфером В трижды по 5 мин и дважды по 15 мин. Образование комплекса между биотинилированным продуктом ПЦР и конъюгатом стрептавидин—пероксидаза регистрировали по накоплению нерастворимого окрашенного продукта ферментативной реакции в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 7,5 (3 мл), содержащем 0,05% орто-дианизидин, 0,06% имидазол, 0,04% Н₂О₂.

Авторы выражают благодарность акад. Д. Г. Кнорре за ценные замечания при обсуждении результатов работы, канд. биол. наук А. Г. Ромащенко за постоянный интерес к работе, д-ру хим. наук А. Г. Плетневу за предоставленные данные по сравнительному анализу нуклеотидных последовательностей двух штаммов, Н. В. Кудряшовой за наработку фрагмента Кленова.

Работа проводилась в рамках программы «Геном человека, генная и клеточная инженерия».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гулд Е., Клегг Дж. Вирусология. Методы. М.: Мир, 1988. С. 66—91.
2. Глини Л., Стьюарт М. Структура и функция антител. М.: Мир, 1983.
3. Jerne N. K. // Ann. Immunol. 1974. V. 125. P. 373—389.
4. Шаповал А. Н. Клещевой энцефаломиелит. Л.: Медицина, 1980.
5. Pletnev A. G., Yamshchikov V. F., Blinov V. M. // Virology. 1990. V. 174. P. 250—263.

6. Добрикова Е. Ю., Плетнев А. Г., Шаманин В. А.//Вопр. вирусологии. 1986. № 6. С. 739—742.
7. Плетнев А. Г., Ямицков В. Ф., Блинов В. Ф.//Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 11. С. 1504—1521.
8. Kneal G., Broun T., Kennard O.//J. Mol. Biol. 1985. V. 186. P. 805—814.
9. Houdebime L.-M.//Nucl. Acids Res. 1976. V. 3. № 3. P. 615—630.
10. Ricchetti M., Vuc H.//EMBO J. 1993. V. 12. № 2. P. 387—396.
11. Jacobson A. B., Good L., Simonetti J., Zuker M.//Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 1. P. 45—52.
12. Shamanin V. A., Pletnev A. G., Rubin S. G., Zlobin V. I.//J. Gen. Virol. 1990. V. 71. P. 1505—1515.
13. Saiki R. K., Walsh P. S.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 16. P. 6230—6234.
14. Годовикова Т. С., Орлова Т. Н., Щеголь Н. Ю., Куликова В. Ф., Венер Т. И., Сабуров В. В., Мчедlishvili Б. В., Зубов В. П. Способ иммобилизации фрагментов нуклеиновых кислот на полимерной подложке. Пат. № 1808014//Б. И. 1993. № 13. С. 227.
15. Воробьева Н. В., Небрат Л. Т., Петрусева И. О., Ромащенко А. Г., Стариковская А. Ф., Шаманина М. Ю. Способ получения обратной транскриптазы из *E. coli*: А. с. 1638162 СССР//Б. И. 1991. № 12. С. 74.
16. Воробьева Н. В., Небрат Л. Т., Потапов В. А., Ромащенко А. Г., Салганик Р. И., Юшкова Л. Ф.//Молекуляр. биология. 1982. Т. 16. № 5. С. 977—983.
17. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М.//Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 14. С. 475—481.
18. Clarke D., Casals J.//Amer. J. Trop. Med. 1958. V. 7. P. 561—573.
19. Шперер К.//Методы вирусологии и молекулярной биологии. М.: Мир, 1972. С. 337—354.
20. Green N. M.//Meth. Enzymol. 1970. V. XVIII A. P. 418—424.
21. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
22. Rigby P. W. J., Dieckmann M., Rhodes C., Berg P.//J. Mol. Biol. 1977. V. 113. № 1. P. 237—251.

Поступила в редакцию
25.XI.1993

После доработки
17.II.1994

*T. S. Godovikova, T. N. Orlova, E. Yu. Dobrikova, V. A. Shamanin,
V. F. Zarytova, N. V. Vorobyeva*, N. A. Serdyukova*,
M. Yu. Shamanina*, I. O. Petruseva*, N. D. Pitsenko***

HIGHLY SENSITIVE NON-RADIOACTIVE DETECTION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk;*

** Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy
of Sciences, Novosibirsk;*

*** Omsk Institute of Natural-Foci Infections, Ministry of Health of the Russia*

The non-radioactive reverse dot-blot method was used for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in clinical specimens. The method involves reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR) using a pair of biotin-labelled oligonucleotide primers. These primers flank a region in the gene of the envelope protein E, which is more conserved than other regions, and initiate the polymerisation with RNAs of all the investigated strains. The amplified cDNA was captured from solution on a solid support using complementary oligonucleotides covalently bound to a polyamide membrane. The biotin labels of the resulting hybrids were visualized by means of the streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. The detection limit of the test was about 10^3 — 10^4 molecules of target RNA. The sensitivity was comparable to that obtained by dot-hybridization of PCR-product with ^{32}P -labelled DNA probe. The method was used for the detection of RNA in specimens of tick and blood.