

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Разрешено Министерством здравоохранения
Республики Беларусь для практического
использования

Заместитель министра здравоохранения,
Председатель Совета по внедрению
В.П. Филонов



2 мая 2001 г.

Регистрационный № 182-0012

ИНСТРУКЦИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЭНТЕРОВИРУСНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДЫ

Учреждение-разработчик: НИИ эпидемиологии и микробиологии

Авторы: Т.В. Амвросьева, О.В. Дьяконова, Н.В. Поклонская

[Перейти к оглавлению](#)

Оглавление

1. ОТБОР ПРОБ И ИХ ОБРАБОТКА	4
2. ПРОЦЕДУРА ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ПЦР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ РНК ПРИСУТСТВУЮЩИХ В ВОДЕ ЭНТЕРОВИРУСОВ	5
2.1. Меры предосторожности и правила работы при постановке ПЦР	5
2.2. Материалы	5
2.3. Подготовка реагентов	6
2.4. Оборудование	7
2.5. Выбор участка–мишени для амплификации и подбор праймерных последовательностей ...	7
2.6. ПЦР-контроли	8
2.7. Выделение РНК	8
2.8. Обратная транскрипция	9
2.9. Полимеразная цепная реакция	11
3. АНАЛИЗ ПЦР-АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ ДНК	13
3.1. Материалы	13
3.2. Подготовка реагентов	13
3.3. Оборудование	14
3.4. Меры предосторожности и правила работы при постановке электрофореза	14
3.5. Постановка	15
3.6. Учет результатов	15
4. ОЦЕНКА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	16

Санитарно-вирусологический контроль питьевых, поверхностных и сточных вод является одним из важных мероприятий, направленных на профилактику вирусных инфекций с водным путем передачи. В основе данного контроля лежат исследования по выявлению в воде патогенных вирусов, способных сохраняться в ней длительное время. К числу наиболее распространенных водных вирусов относятся энтеровирусы, присутствие которых в воде, используемой для хозяйственно-питьевых и культурно-бытовых целей, может быть причиной серьезного обострения эпидситуации в виде вспышек и эпидемий водного происхождения.

Золотым стандартом, подтверждающим наличие энтеровирусного загрязнения воды, является выделение инфекционных энтеровирусов на чувствительных культурах клеток. Однако данная процедура является весьма длительной (до 1 мес.) и трудоемкой. Полученные результаты могут быть оценены чаще всего ретроспективно, что не может удовлетворить специалистов, осуществляющих микробиологический контроль качества воды, особенно в случаях обострения эпидситуации, требующих быстрого реагирования и принятия противоэпидемических мер. В этих условиях велика актуальность применения экспресс-методов выявления вирусного загрязнения воды, позволяющих оперативно выявить сам факт присутствия в водной среде материала патогенных энтеровирусов.

К числу таких методов относится полимеразная цепная реакция (ПЦР), с помощью которой можно обнаружить в исследуемой воде, энтеровирусную рибонуклеиновую кислоту (РНК) за сравнительно короткий промежуток времени — 24–36 ч.

1. ОТБОР ПРОБ И ИХ ОБРАБОТКА

1.1. Отбор проб и их концентрирование осуществляют стандартными методами в соответствии с действующими в РБ методическими документами: 1) Методики по санитарно-вирусологическому контролю питьевой воды и оценка ее эпидемической безопасности (для системы централизованного хозяйственно-бытового водоснабжения) (Минск, регистр. № 136-9811 от 18.05.99г.); 2) Методические рекомендации «Сбор и концентрирование кишечных вирусов из воды с помощью водопроницаемых пакетов с адсорбентом» (Минск, регистр. № 57-9707 от 18.12.97 г.).

1.2. Полученный элюат (3 мл) подвергают дополнительному концентрированию. В зависимости от уровня технического оснащения лаборатории выбирают один из следующих методов:

1.2.1. Ультрацентрифугирование элюата.

Ультрацентрифугирование проводят при 40 000–50 000 g в течение 2 ч с использованием угловых или бакет-роторов. В стерильную центрифужную пробирку наливают вирусосодержащий элюат, а затем с помощью шприца на дно пробирки наслаивают 10–20% раствор сахарозы так, чтобы она занимала 5–10% от объема пробирки. После центрифугирования супернатант удаляют. Осадок ресуспендируют в 1 мл стерильной дистиллированной воды.

1.2.2. Обработка элюата полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000).

ПЭГ-6000 и хлористый натрий добавляют в элюат, находящийся непосредственно в пробирках для центрифугирования, до конечных концентраций 10% и 0,5 моль, соответственно. Смесь тщательно перемешивают до растворения ПЭГ и затем выдерживают в течение 10–12 ч при +4° С. Образовавшуюся суспензию центрифугируют при 10 000g в течение 1 ч либо при 6 000g в течение 2 ч. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в 1 мл стерильной дистиллированной воды.

2. ПРОЦЕДУРА ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ПЦР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ РНК ПРИСУТСТВУЮЩИХ В ВОДЕ ЭНТЕРОВИРУСОВ

2.1. Меры предосторожности и правила работы при постановке ПЦР

Все манипуляции с элюатами проводят при соблюдении правил работы с вирусами III–IV группы.

Все этапы ПЦР выполняют в стерильных условиях с использованием перчаток, свободных от талька.

Постановку ПЦР осуществляют как минимум в 3 рабочих зонах. Зона 1 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) — подготовка ПЦР-реагентов. Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) — подготовка проб и контролей, выделение РНК, внесение проб в пробирки с ПЦР-реагентами. Зона 3 — проведение амплификации и детекция амплифицированной ДНК. Пробы из Зоны 3 не следует переносить в Зоны 1 и 2 во избежание контаминации ДНК-матрицей. Пипетки или наконечники должны иметь аэрозольный барьер. Перчатки и халаты меняют при переходе из одной зоны в другую.

2.2. Материалы:

- фенол;
- 8-оксихинолин;
- β-меркаптоэтанол;
- трисгидроксиметиламинометан (Трис);
- гликоген ;
- цитрат натрия;
- хлороформ;
- изопропанол;

- этанол;
- изоамиловый спирт;
- 5x или 10x буфер для обратной транскрипции (поставляется в наборах для обратной транскрипции);
- обратная транскриптаза (вируса птичьего миелобластома или вируса лейкемии мышей Молони) (поставляется в наборе);
- смесь дезоксинуклеотрифосфатов (ДНТФ);
- ингибитор РНК-азы;
- олигонуклеотиды (прямой и обратный праймеры не менее 3 ОЕ/мл).
- 10x ПЦР-буфер с $MgCl_2$ или ПЦР-буфер без $MgCl_2$;
- раствор $MgCl_2$;
- Taq-полимераза;
- минеральное масло;
- свободная от рибонуклеаз вода;
- диэтилпиракарбонат (ДЭПК).

2.3. Подготовка реагентов:

- фенол готовят посредством добавления 8-оксихинолина до конечной концентрации 0,1% к расплавленному при $68^\circ C$ перегнанному фенолу и затем несколько раз насыщают равным объемом буфера — 0,1 моль Трис HCl pH 6,5–7 и буфера 0,1 моль Трис HCl pH 6,5–7 + 0,2% β -меркаптоэтанол;
- хлороформ готовят, смешивая его с изоамиловым спиртом в соотношении 24/1;
- свободную от рибонуклеаз воду готовят посредством обработки деионизованной или бидистиллированной воды 0,1% ДЭПК при $37^\circ C$ в течение ночи с последующим автоклавированием при 0,5 Атм 15 мин.

2.4. Оборудование:

- ламинарный бокс или УФ стерилизуемое помещение;
- одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5; 0,5; 0,2 мл);
- автоматические пипетки объемом от 0,5 мкл до 1мл.
- сменные одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами;
- центрифуга типа «Эппендорф» с охлаждением и скоростью не менее 10 000 g;
- встряхиватель (вортекс);
- термоциклер (амплифицирующее устройство);

2.5. Выбор участка–мишени для амплификации и подбор праймерных последовательностей

Праймеры синтезируют на заказ ряд фирм — DuPont, Perkin-Elmer Cetus, «Литех». Мишень для амплификации должна иметь длину не менее 100 нуклеотидов, т.к. визуализация более коротких последовательностей в агарозных гелях затруднена и, кроме того, расстояние в 100–1000 п.н. является оптимальным для работы праймеров. При подборе праймерных последовательностей следует руководствоваться принципом специфичности и консервативности, т.е. праймеры должны быть специфичны для энтеровирусов и консервативны в пределах всех серотипов энтеровирусов. ПЦР-праймеры обычно имеют размер 15–25 нуклеотидов и должны иметь содержание G/C в пределах 40–75%. Удобны в практическом применении праймерные последовательности, фланкирующие мишень 196 нуклеотидов, расположенную в 5'-консервативной части генома энтеровирусов. Это прямой праймер F 5'-CACCGGATGGCCAATCCA–3' и обратный праймер R 5'-TCCGGCCCCTGAATG-3'. Обратный праймер представляет собой последовательность комплементарную мишени, а прямой — полностью соответствует.

2.6. ПЦР-контроли

Для контроля специфичности ПЦР используют положительный и отрицательные контроли. В качестве положительного контроля используют любой энтеровирус (вируссодержащая культуральная жидкость), в качестве отрицательных контролей используют стерильную дистиллированную воду и вирус не принадлежащий к роду энтеровирусов (например, ротавирус). Все манипуляции, начиная с выделения РНК, проводят для проб и контролей.

2.7. Выделение РНК

2.7.1. Постановка:

- 400 мкл пробы после дополнительного концентрирования и контроли переносят в отдельные 1,5 мл центрифужные пробирки типа «Эппендорф»;
- вносят 1 мкл гликогена* и 40 мкл ацетата натрия и тщательно перемешивают;
- добавляют 440 мкл смеси фенол/хлороформ (5/1) и перемешивают;
- после перемешивания смесь выдерживают на льду в течение 10–20 мин;
- центрифугируют при 10 000–12 000 g в течение 10 мин при 4° С;
- после центрифугирования верхнюю водную фазу, содержащую РНК, осторожно отбирают и переносят в новые пробирки;
- проводят экстракцию с помощью хлороформа, добавляя 1 объем смеси хлороформ/изоамиловый спирт и тщательно перемешивают;
- центрифугируют при 10 000–12 000g в течение 10 мин при 4° С;
- верхнюю водную фазу переносят в новые пробирки;
- проводят преципитацию посредством добавления к пробе равного объема изопропанола с последующим охлаждением в течение 1 ч при –20° С;

- смесь пробы с изопропанолом центрифугируют (10 000–12 000g 15 мин при 4° С);
- жидкость удаляют, стараясь не повредить образовавшийся осадок, который подсушивают, перевернув открытые пробирки на стерильную фильтровальную бумагу;
- осадок отмывают добавлением 70% этанола и центрифугируют (10 000–12 000g 10 мин);
- жидкость удаляют, а осадок подсушивают, как указано выше;
- содержащий РНК осадок ресуспендируют в свободной от рибонуклеаз воде.

2.7.2. Хранение выделенной РНК.

РНК можно хранить в течение 1 мес. в изопропанолу при – 20° С.

Для длительного хранения к раствору РНК добавляют 2 объема 70% этанола и помещают на –70° С.

2.8. Обратная транскрипция

Стандартные реакционные смеси для обратной транскрипции производятся различными фирмами (Sigma, Promega, Amersham). В состав реакционных смесей входят буферный раствор(ы) и фермент – обратная транскриптаза (ревертаза) различного происхождения. Ингибитор РНК-азы и смесь ДНТФ поставляются отдельно. Постановка:

- в 0,2 мл или 0,5 мл пробирки вносят 10–14,5 мкл пробы, 1 мкл ДНТФ (100–200 мкмоль), 0,1–1 мкмоль обратного праймера R (1ОЕ= 30–35 мкг ДНК-праймера);
- смесь аккуратно перемешивают и помещают в термоциклер на 70° С 10 мин;
- по истечении времени нагревания пробирки достают и помещают на лед на 3–5 мин;
- в пробы добавляют 5X или 10X буфер для обратной транскрипции (конечная концентрация-1X), фермент — обратная транскриптаза (100–200 ед.), ингибитор РНК-азы (20 ед.). Общий объем реакционной смеси составляет 20 мкл. Объем реакционной

смеси при необходимости доводят с помощью свободной от РНК-аз воды.

- смесь перемешивают и выдерживают при комнатной температуре 10–15 мин;
- пробирки помещают в термоциклер и выдерживают 50 мин при 37–42° С (время и температура необходимые для работы фермента указываются в инструкции производителя).

После синтеза кДНК на РНК-матрице пробы используют для ПЦР-амплификации.

Оптимальные условия и количества реагентов варьируют в зависимости от производителя.

Пример постановки при использовании реакционной смеси № А4464 фирмы Sigma:

- в 0,2 мл или 0,5 мл пробирки вносят 14,5 мкл пробы, 1 мкл ДНТФ №D7295 и 1 мкл обратного праймера R (при концентрации 12 ОЕ/мл);
- смесь аккуратно перемешивают и помещают в термоциклер на 70° С 10 мин;
- пробирки достают и помещают на лед;
- добавляют 2 мкл 10Х буфера, 1 мкл обратной транскриптазы (200 ед.), 0,5 мкл ингибитора РНКазы №R2520 (общий объем 20 мкл);
- смесь перемешивают и выдерживают при комнатной температуре 15 мин;
- пробирки помещают в термоциклер и выдерживают 50 мин при 42° С.

2.9. Полимеразная цепная реакция

Основой ПЦР является использование термостабильной ДНК–полимеразы, выделенной из *Thermus aquaticus* (Taq–полимераза) и инкубация при трех разных температурах, соответствующих трем этапам цикла: денатурация мишени (90–95° С), отжиг (40–60° С) и удлинение праймера (72° С).

Инкубацию проводят в термоциклерах, современные варианты которых обладают микропроцессорным управлением.

Подбор условий амплификации:

- устанавливают температуру денатурации. Температура денатурации 94–95°С, как правило, приемлема для всех мишеней. Более длительный начальный прогрев 5 мин при 95° С обеспечивает полную денатурацию всех молекул ДНК в образце, увеличивая эффективность ПЦР;
- устанавливают температуру отжига праймеров. Оптимальной как правило является температура на 5° С ниже температуры плавления праймера, которую высчитывают исходя из длины праймеров и GC–содержания по формуле $4^{\circ} \text{C} \times (\text{G} + \text{C}) + 2^{\circ} \text{C} \times (\text{A} + \text{T})$. Температура отжига, как правило, находится в диапазоне 40–65° С;
- устанавливают температуру удлинения праймера (элонгации), которая составляет 72° С и является оптимальной для работы Taq–полимеразы;
- устанавливают количество циклов, которое может варьироваться от 35 до 50;
- после прохождения циклов желательно провести элонгацию при 72° С 7–10 мин и затем установить режим хранения проб при +4° С.

Пример условий амплификации для матрицы 196 нуклеотидов и праймеров F и R:

95° С – 5 мин

40 циклов: 95° С – 1 мин, 55°С – 1мин 30 с, 72° С – 1 мин 30 с

72° С – 7 мин

+4° С – режим хранения

Постановка:

- в рабочей Зоне 1 проводят подготовку ПЦР-смеси (в 0,2 мл или 0,5 мл пробирках): 10 мкл 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X), 2 мкл ДНТФ (100–200 мкмоль), 1 мкл праймера F (0,3 мкмоль при ОЕ=12), 1 мкл праймера R (0,3 мкмоль при ОЕ=12), 0,5–1,0 мкл Taq-полимеразы (2,5–5 ед.) (общий объем 14–15 мкл);
- 1–10 мкл пробы после обратной транскрипции вносят в подготовленную ранее пробирку с ПЦР-смесью;
- объем доводят до 100 мкл с помощью свободной от ДНК-аз воды;
- минеральное масло в объеме 100 мкл наслаивают на подготовленные пробы в случае использования 0,5 мл пробирок и термоциклеров без крышки;
- пробы помещают в термоциклер и проводят соответствующие режимы амплификации;
- объем реакционной смеси может составлять 50, 25 мкл, что дает возможность более точного соблюдения температурных режимов внутри пробирки при этом концентрации реагентов не изменяются.
- Реакционные смеси поставляются различными фирмами (Sigma, Promega, Amersham).

3. АНАЛИЗ ПЦР-АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ ДНК

Для анализа ПЦР-амплифицированной ДНК используют разные методы, наиболее простым из которых является гель-электрофорез.

3.1. Материалы:

- агароза для электрофорезов;
- ДНК-маркер 50–1000 пар оснований;
- ЭДТА;
- фиколл;
- бромфеноловый синий;
- Трис;
- бромистый этидий;
- ледяная уксусная кислота;
- борная кислота.

3.2. Подготовка реагентов:

- буферы для электрофореза: ТАЕ (50X) на 1 л — 0,04 моль Трис-ацетат (242 г Трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты); 0,002 моль ЭДТА (100 мл 0,5 моль ЭДТА pH 8,0); ТБЕ (5X) на 1 л — 0,089 моль Трис-борат (54 г Трис, 27,5 г борной кислоты); 0,002 моль ЭДТА (20мл 0,5М ЭДТА pH 8,0);
- 3–4% агароза — 3–4 г агарозы на 100мл 1X буфера ТАЕ или ТБЕ. агарозу плавят на водяной бане при 100° С до полного расплавления;

- бромистый этидий — матричный раствор 10 мг/мл. Бромистый этидий вносят из матричного раствора в аликвоту расплавленной остывшей до 55–56° С агарозы до конечной концентрации 0,1–10 мкг/мл.
- буфер для проб: 0,25% бромфеноловый синий, 20% фиколл 400, 0,1 моль ЭДТА.

3.3. Оборудование:

- прибор для горизонтального электрофореза;
- гребенки для горизонтального электрофореза;
- источник питания (источник постоянного тока);
- трансиллюминатор;
- фото- или видеокамера с фильтрами для съемки в УФ;
- автоматические пипетки и наконечники.

3.4. Меры предосторожности и правила работы при постановке электрофореза

Реагент бромистый этидий является сильным мутагеном, поэтому все манипуляции проводят с использованием перчаток. Все электрофорезные емкости и приспособления тщательно промывают до и после работы с помощью детергента, проточной воды и дистиллированной воды. Лунки в агарозе должны находиться возле катода («←» или черный электрод).

3.5. Постановка:

- в электрофорезную кювету вставляют гребенку так, чтобы расстояние между дном кюветы и зубцами гребенки составляло 1–2 мм;
- подготовленную агарозу заливают в электрофорезную кювету с гребенкой и дают ей застыть;
- после застывания агарозы гребенку аккуратно достают, стараясь не повредить образовавшиеся лунки;
- в случае использования минерального масла проводят подготовку ПЦР-продуктов, добавляя 100 мкл хлороформа с последующим встряхиванием и центрифугированием при 12000 g в течение 1 мин. Верхнюю водную фазу переносят в новые пробирки. Пробы, амплифицированные без минерального масла не требуют подготовки;
- 15 мкл ПЦР-амплифицированной подготовленной пробы вносят в чистые пробирки и добавляют 5 мкл буфера для проб, перемешивают;
- прибор для электрофореза наполняют 1X буфером ТАЕ или ТБЕ так, чтобы агароза была полностью им покрыта;
- через слой жидкости, внимательно, в отдельные лунки вносят по 15–20 мкл ДНК-маркера, положительные и отрицательные контроли и пробы;
- электрофорез проводят при достаточно высоком напряжении 10–15 В/см, однако, в случае очень высоких напряжений полосы маркера плохо разделяются, что затрудняет учет. Полоса в 196 нуклеотидов движется приблизительно в соответствии с красителем.

3.6. Учет результатов

Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора. При этом агарозный гель либо достают из кюветы и помещают на стекло трансиллюминатора либо используют емкости из УФ-прозрачных материалов.

Наличие светящейся полосы или пятна размером 196 нуклеотидов в соотношении с ДНК-маркером свидетельствует о присутствии в пробе РНК-энтеровирусов.

Результаты фиксируют посредством фотографирования или видеосъемки геля при использовании УФ-фильтров.

Выявление РНК-энтеровирусов в обработанных пробах воды можно осуществлять также с помощью коммерческих тест-систем, производимых фирмой Roche (США). Исследования в данном случае проводятся в строгом соответствии с прилагаемой к данной тест-системе инструкцией.

4. ОЦЕНКА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обнаружение РНК-энтеровирусов в пробах воды свидетельствует о факте ее энтеровирусного загрязнения. Для оценки эпидбезопасности воды в отношении энтеровирусных инфекций необходимы дополнительные исследования по обнаружению в ней инфекционных энтеровирусов.

