УДК 636.2:591.2

А.Ю. Просеков, И.С. Милентьева, М.В. Новоселова, Е.Е. Драгунова

ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ЖИВОТНОЙ ДНК В ПРОБАХ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СОСТАВАХ НА ИХ ОСНОВЕ

Исследования образцов биологического материала проводили с целью выявления эффективности выделения и качества очистки ДНК. Выбран оптимальный высокопроизводительный метод выделения животной ДНК из проб биологического происхождения и многокомпонентных составов на их основе. Изучено количественное содержание животной ДНК в пробах биологического происхождения и многокомпонентных составах на их основе.

Белок, идентификация, диагностика, инфекция, прионные болезни человека и животных, молекулярно-биологические исследования.

Введение

В последние годы обнаружена группа заболеваний, характеризующихся прогрессирующим поражением различных отделов нервной системы и имеющих необычный генетический механизм возникновения и развития. На основании сходства морфологического дефекта при этих заболеваниях их объединяют в группу спонгиоформных энцефалопатий. Долгое время считалось, что клинические симптомы этих болезней возникают при попадании в организм инфекционного агента, имеющего антигенное сродство к нервным клеткам. Предполагалось, что в этом случае запускается механизм иммунного ответа, продолжающийся и после исчезновения из организма инфекционного агента, что приводит к образованию комплекса «антиген-антитело» и гибели нейронов. Вскоре стало ясно, что основная патогенетическая роль в развитии этих заболеваний принадлежит белковому агенту, который было предложено называть прионом (PRION – от англ. Proteinaceous Infectious particle, с перестановкой двух букв). В настоящее время установлено, что заболевания этой группы имеют двоякую этиологию: первая группа болезней возникает в результате мутации в гене прионного белка, вторая – обусловлена попаданием в организм человека инфицированного биологического материала [1].

В группу прионных болезней входят куру, болезнь Крейтцфельдта-Якоба (БКЯ), болезнь Герстмана-Штросслера и летальная семейная инсомния. Обычно ее описывают совместно с вирусными инфекциями центральной нервной системы, но их природа совершенно другая – они вызваны накоплением аномальной изоформы прионного белка (PrPSc). Эта изоформа, как и нормальный прионный белок (PrPC), кодируется геном PRNP, расположенным на коротком плече 20-й хромосомы.

Источник инфекционной формы прионов – овцы и козы, у которых спонтанно может развиваться заболевание, известное под названием «скрэпи». Группа прионных заболеваний животных включает, кроме того, трансмиссивные спонгиоформные энцефалопатии норок, оленей и лосей, крупного рогатого скота, кошек и собак, антилоп, тигров, гепардов [2].

В мире известно шесть прионных болезней животных и четыре – человека. Если во второй половине 90-х годов эпизоотическая ситуация стала стабилизироваться за счет последовательного снижения заболеваемости в Великобритании (от 37 тыс. случаев в 1992 г. до менее 5 тыс. в 1997 г.), то в 2000 г. вновь произошло обострение ситуации за счет возросшего неблагополучия в других западноевропейских странах, прежде всего во Франции. Случаи «коровьего бешенства», помимо Великобритании, зарегистрированы в Ирландии, Нидерландах, Франции, Португалии, Швейцарии, Германии, Италии, Омане, Канаде, Дании и на Фолклендских островах. Все эти случаи были связаны с импортом зараженных животных или зараженной мясокостной муки.

По статистическим данным в России с населением примерно 150 миллионов болезнь Крейтцфельдта-Якоба ежегодно поражает около 150 человек. Однако это не значит, что в отношении прионных инфекций у нас все благополучно. Учет таких пациентов ведется плохо: случаи заболевания не выявляются и не регистрируются, в то время как, например, во Франции создана специальная сеть по надзору, которая отслеживает каждый случай заражения БКЯ.

Поэтому на современном этапе является важным налаживание в общегосударственном масштабе работы по регистрации прионных болезней человека и животных на всей территории страны с обращением особого внимания на группы риска (работники скотоводческих и звероферм, боен, мясокомбинатов и др.) [3].

Одним из сложных вопросов является диагностика прионных заболеваний. При этом диагноз ставится клинически, а морфологическая диагностика этих болезней проводится на основании исследования биопсийного или аутопсийного материалов. В последние 10 лет произошел значительный прогресс в исследовании молекулярной биологии прионов и диагностике вызываемых ими заболеваний. Созданы трансгенные мыши и модели прионных инфекций в культуре тканей, получены панели моноклональных антител к PrP, созданы системы для диагностики прионных болезней, основанные на различных принципах детекции PrPsc. Разработан ряд коммерческих

тест-систем, которые позволяют осуществлять быстрые и точные анализы аутопсийного материала. С их помощью в странах ЕС производят скрининг всех животных крупного рогатого скота, поступающих на бойни [2, 4].

Важное значение в диагностике болезни Крейтцфельдта-Якоба имеет ЭЭГ-исследование. При этом на ранних этапах болезни наблюдается замедление биоэлектрической активности. Состав цереброспинальной жидкости при прионных болезнях обычно нормальный, воспалительная реакция в ней отсутствует.

В настоящее время самым надежным и достоверным методом диагностики БКЯ и других прионных заболеваний является иммуноцитохимический метод выявления в биоптате отложения PrPSc. Инфекционная изоформа PrPSc откладывается в синапсах коры большого мозга и мозжечка, а также в амилоидных бляшках. Отложение PrPSc является наиболее ранним этапом в развитии БКЯ и определяется еще до развития структурных изменений в ткани мозга. Однако эта методика (иммуноцитохимическое исследование и иммуноблоттинг) находится уже за рамками чисто морфологических методов и требует специальных реактивов и оборудования.

Постоянно увеличивающийся теоретический интерес к проблеме обусловлен результатами молекулярно-биологических исследований структуры прионных белков. Уже получен значительный фактический материал о структуре, функции и накоплении в зараженном организме этих новых и необычных возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных [5, 6].

Результаты последних работ, посвященных количественному определению нормальной формы прионового белка и его патогенной изоформы в зараженном материале, свидетельствуют о том, что уровень чувствительности подобного теста должен соответствовать нескольким атоммолям. Очевидно, на современном этапе перспективными для разработки преклинической диагностики прионных инфекций являются современные методы протеомики и нанотехнологий, включая сканирующую зондовую и атомно-силовую микроскопию.

В связи с этим изучение прионового белка и его патогенной изоформы является актуальным вопросом для разработки преклинической диагностики, а также развития новых направлений в дальнейших подходах к терапии прионных болезней.

Объекты и методы исследований

В работе проведен выбор высокопроизводительного метода выделения животной ДНК из проб биологического происхождения и многокомпонентных составов на их основе. Выбор объектов исследования обусловлен тем, что продукты переработки крупного рогатого скота используются в различных видах промышленности (медицинской, фармацевтической, пищевой).

В качестве объектов исследования использовали: мозг (усредненная проба серого и белого вещества); цельная кровь; образцы мяса; колбаса вареная; цельное молоко; сыр; желатин.

Образцы мозга, мяса и крови отбирали у животных, прошедших ветеринарный контроль, туши были признаны пригодными для употребления в пищу человеком.

Перед выделением ДНК независимо от метода экстракции осуществляли первичную обработку проб исследуемого материала. При анализе мягких материалов, легко поддающихся измельчению (мясо, сыр и пр.), отбирали усредненную пробу продукта массой 1 г, измельчали при помощи стерильных скальпеля, ножниц и одноразового шпателя и гомогенизировали фарфоровым пестиком в керамической ступке, тщательно перемешивая содержимое.

Пробы сухих сыпучих материалов (желатин) и жидких или полужидких материалов (молоко, кровь и пр.), не требующих измельчения и однородных по составу, при помощи одноразового шпателя или пипетированием вносили в чистую пробирку типа «Эппендорф» в количестве 100–150 мкл по насыпному объему (5–7 мм от дна пробирки). Для предотвращения перекрестной контаминации инструменты для измельчения материала использовали однократно, тщательно мыли и стерилизовали после использования или при переходе от пробы к пробе.

Концентрацию ДНК в образцах оценивали спектрофотометрическим методом и рассчитывали по формуле

$$C_{ДНК}(\mu g/\mu l) = \frac{OD_{260} x 100(фактор_дилюции) x 50 \mu g/\mu l}{1000},$$

где $C_{днк}$ – концентрация ДНК; OD_{260} – оптическая плотность раствора ДНК при длине волны 260 нм.

Результаты и их обсуждение

Подбор объектов исследования из сырья животного происхождения и продуктов на его основе выбран с учетом того, что водорастворимая фракция белков имеет высокую степень инфективности в отношении патогенной формы прионного белка. Анализ литературных данных показал, что эффективность выделения и качество очистки ДНК оказывают непосредственное влияние на результаты ПЦР-анализа, так как низкая концентрация ДНК-матрицы и присутствие в пробе ингибиторов реакции являются наиболее частой причиной ложноотрицательных результатов ПЦР [4]. В связи с этим в наши задачи входили выбор и оценка способов экстракции ДНК и их апробация на различном материале. Для этого было выбрано пять принципиально отличающихся методик выделения ДНК.

1. Лизис с использованием ионного детергента (додецил сульфата натрия) с фенол-хлороформовой экстракцией и осаждением ДНК этанолом [5].

2. Щелочной лизис с фенол-хлороформовой экстракцией и осаждением ДНК этанолом [4].

3. Лизис на основе гуанидинтиоционата с последующей нуклеосорбцией на силикагеле с использованием коммерческого набора реагентов SILICA M («Биоком», Москва) [1].

4. Лизис на основе гуанидинтиоционата с последующей нуклеосорбцией на магнитном силикагеле с использованием коммерческого набора реагентов

Magn S_DNA-uni («Биоком», Москва) [1].

5. Выделение ДНК с помощью ионного детергента цетилтриметиламмония бромида с использованием коммерческого набора реагентов ПРОБА-ЦТАБ (ДНК-технология, Москва) [4].

Экстракцию ДНК проводили во всех образцах в двадцати повторностях. Количество исследуемых образцов в случае лизиса с использованием ионного детергента (додецил сульфата натрия) с фенол-хлороформовой экстракцией и осаждением ДНК этанолом меньше, поскольку он занимет значительное время, до 6 часов.

Оценку эффективности выделения ДНК из проб биологического происхождения и многокомпонентных составов на их основе проводили посредством сопоставления результатов ПЦР с участием ДНК, выделенной пятью указанными способами.

Параметрами оценки являлись уровень чувствительности и воспроизводимость результатов ПЦР с использованием того или иного способа экстракции ДНК, а также наличие или отсутствие фоновой амплификации, приводящей к появлению шмеров на электрофореграмме. Воспроизводимость ПЦР – это количество положительных результатов исследований из 100. Чувствительность – это количество образца в анализируемой пробе. Результаты сравнительного анализа ПЦР с участием ДНК, выделенной различными способами, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние методик выделения ДНК на эффективность ПЦР

Методика экстракции ДНК	Общее количество исследований, шт.	Чувствительность, ПЦР	Воспроизводимость результатов ПЦР	Наличие фоновой амплификации (шмеры)
С фенол-хлороформовой экстракцией	66	0,1 %	94	+
Щелочной лизис	140	3 %	53	+
SILICA M	140	0,1 %	100	–
Magn S_DNA-uni	140	0,1 %	100	–
ПРОБА-ЦТАБ	140	0,1 %	100	–

Исходя из выбранных критериев оценки наиболее эффективными оказались методики, одновременно обеспечивающие удовлетворительную экстракцию ДНК и наиболее полную ее очистку.

Методика щелочной экстракции оказалась малопригодной для выделения ДНК из проб животного происхождения, поскольку приходилось увеличивать количество ДНК в пробе для появления продуктов амплификации после проведения электрофореза. При этом также происходило увеличение количества ложноотрицательных проб во всех исследуемых образцах. Следствием этого, вероятно, являлись недостаточная эффективность лизирующего буфера на основе NaOH, а также значительные потери ДНК при переосаждении.

При помощи лизиса на основе гуанидинтиоционата с последующей нуклеосорбцией на силикагеле с использованием коммерческого набора реагентов SILICA M, лизиса на основе гуанидинтиоционата с последующей нуклеосорбцией на магнитном силикагеле с использованием коммерческого набора реагентов Magn S_DNA-uni и экстракции ДНК с помощью ионного детергента цетилтриметиламмония бромида с использованием коммерческого набора реагентов ПРОБА-ЦТАБ ингибирующего действия разнообразных компонентов, присутствующих в сложносоставных пробах, не зафиксировано.

Применение коммерческих наборов полностью исключило ложноотрицательные результаты в ходе исследования. При использовании коммерческих продуктов время анализа занимало порядка 2 часов.

Поскольку эффективность ПЦР в значительной степени определяется отсутствием в ДНК-пробе ингибиторов реакции, нами была проведена работа по определению степени чистоты выделенных ДНК.

Сущность методики определения чистоты ДНК сводится к измерению оптической плотности (D) ДНК при 260 и 280 нм, с последующим расчетом отношения D_{260}/D_{280}. Для чистых препаратов ДНК это соотношение должно соответствовать значению 1,8–2,0. В случае если D_{260}/D_{280} меньше 1,8, это указывает на недостаточную очистку пробы от белков и других поглотителей УФ; если же D_{260}/D_{280} больше 2,0, это указывает на присутствие в пробе фенола или хлороформа. Для оценки чувствительности использовали разведения ДНК с концентрацией от 2,4 пг до $2{,}4*10^6$ пг на 20 мкл реакционной ПЦР-смеси.

Для статистической обработки данных количественные определения содержания ДНК проводили во всех выделенных образцах животного происхождения. Результаты спектрофотометрического анализа препаратов ДНК при 260 нм представлены в табл. 2, при 280 нм – в табл. 3, соотношение D_{260}/D_{280} – в табл. 4.

Таблица 2

Среднее значение оптической плотности образцов при 260 нм

Наименование образца	Значение оптической плотности при 260 нм (D_{260})				
	С фенол-хлороформовой экстракцией	Щелочной лизис	SILICA M	Magn S_DNA-uni	ПРОБА-ЦТАБ
Мозг (усредненная проба серого и белого вещества)	0,231	0,258	0,196	0,191	0,198
Цельная кровь	0,221	0,195	0,192	0,192	0,197
Образцы мяса	0,201	0,191	0,189	0,188	0,195
Колбаса вареная	0,194	0,220	0,192	0,189	0,190
Цельное молоко	0,194	0,221	0,195	0,198	0,193
Сыр	0,195	0,225	0,198	0,197	0,192
Желатин	0,204	0,257	0,198	0,199	0,190

Из данных, представленных в таблице, видно, что соотношение D_{260}/D_{280} для препаратов ДНК, полученных с помощью коммерческих реактивов, лежит в пределе 1,8–2,0, что указывает на хорошее качество их очистки. В связи с этим возможное отрицательное влияние ингибиторов ПЦР, содержащихся в образцах, можно считать минимальным.

Таблица 3

Среднее значение оптической плотности образцов при 280 нм

Наименование образца	Значение оптической плотности при 280 нм (D_{280})				
	С фенол-хлороформовой экстракцией	Щелочной лизис	SILICA M	Magn S_DNA-uni	ПРОБА-ЦТАБ
Мозг (усредненная проба серого и белого вещества)	0,111	0,121	0,108	0,099	0,108
Цельная кровь	0,106	0,091	0,104	0,099	0,108
Образцы мяса	0,096	0,091	0,103	0,098	0,107
Колбаса вареная	0,095	0,101	0,106	0,096	0,099
Цельное молоко	0,094	0,106	0,107	0,106	0,099
Сыр	0,096	0,107	0,108	0,106	0,101
Желатин	0,100	0,119	0,110	0,109	0,102

Таблица 4

Отношение оптических плотностей, полученных при 260 и 280 нм

Наименование образца	Отношение D_{260}/D_{280}				
	С фенол-хлороформовой экстракцией	Щелочной лизис	SILICA M	Magn S_DNA-uni	ПРОБА-ЦТАБ
Мозг (усредненная проба серого и белого вещества)	2,08	2,13	1,81	1,92	1,83
Цельная кровь	2,09	2,15	1,81	1,94	1,82
Образцы мяса	2,1	2,09	1,83	1,92	1,82
Колбаса вареная	2,05	2,17	1,81	1,96	1,92
Цельное молоко	2,07	2,08	1,82	1,86	1,94
Сыр	2,03	2,1	1,84	1,85	1,91
Желатин	2,04	2,16	1,80	1,82	1,87

Отношение D_{260}/D_{280} для образцов ДНК, полученных при использовании лизиса с использованием ионного детергента (додецил сульфата натрия) с фенол-хлороформовой экстракцией и осаждением ДНК этанолом и щелочного лизиса с фенол-хлороформовой экстракцией и осаждением ДНК этанолом, колеблется от 2,03 до 2,10, что свидетельствует о том, что в пробе остались фенол или хлороформ, вследствие чего образцы теряют свою презентативность.

Анализ табл. 2 и 3 показывает, что наибольшее количество животной ДНК из проб биологического происхождения содержится в образцах, полученных лизисом на основе гуанидинтиоционата с последующей нуклеосорбцией на магнитном силикагеле с использованием коммерческого набора реагентов Magn S_DNA-uni («Биоком», Москва). Наибольшее количество животной ДНК из многокомпонентных проб животного происхождения содержится в образцах, полученных при выделении ДНК с помощью ионного детергента цетилтриметиламмония бромида с использованием коммерческого набора реагентов ПРОБА-ЦТАБ (ДНК-технология, Москва).

Анализ отношения оптических плотностей D_{260}/D_{280} для образцов ДНК, полученных при помощи лизиса на основе гуанидинтиоционата с последующей нуклеосорбцией на силикагеле с использо-

ванием коммерческого набора реагентов SILICA M («Биоком», Москва), показывает, что ДНК содержится в допустимом пределе от 1,8 до 2,0. Однако все получаемые значения близки к нижней границе. Возможно, что в пробах с ДНК сохранились белковые составляющие, хотя они и не снижают качества получаемых образцов.

Таким образом, исследования позволяют сделать вывод, что оптимальным для исследования ДНК животного происхождения из рассматриваемых методов для анализа биологических проб является лизис на основе гуанидинтиоционата с последующей нуклеосорбцией на магнитном силикагеле с использованием коммерческого набора реагентов Magn S_DNA-uni («Биоком», Москва), а для исследования многокомпонентных проб – выделение ДНК с помощью ионного детергента цетилтриметиламмония бромида с использованием коммерческого набора реагентов ПРОБА-ЦТАБ (ДНК-технология, Москва).

Выводы

Для того чтобы детально отработать все стадии реализации метода, необходимо проводить идентификацию как патогенной формы прионного белка, так и нормальной. Это позволит оценить потенциальную инфективность различных образцов проб биологического происхождения и многокомпонентных составов на их основе.

Для получения более точных результатов нами были экспериментально подобраны условия оценки способов экстракции ДНК и проведена их апробация на различном материале, так как эффективность выделения и качество очистки ДНК оказывают непосредственное влияние на результаты ПЦР-анализа. В свою очередь, качество очистки ДНК позволит проводить ПЦР-диагностику на содержание патогенной формы прионного белка с высокой точностью.

Список литературы

1. Покровский, В.И. Прионы и прионные болезни / В.И. Покровский, О.И. Киселев, Б.Л. Черкасский. – М.: РАМН, 2004. – 384 с.

2. Интернет-источник http://medicalplanet.su/genetica/201.html

3. Somerville, R.A. Immunodetection of PrPSc in spleens of some scrapie infected sheep but not BSE infected cows / R.A. Somerville, C.R. Birkett, C.F. Farquhar // J. Gen. Virol. – 1997. – Vol. 78. – P. 2389–2396.

4. Интернет-источник http://www.eurolab.ua/encyclopedia/323/2260/

5. Галкин, А.П. Прионы дрожжей, амилоидозы млекопитающих и проблема протеомных сетей / А.П. Галкин, Л.Н. Миронова, Г.А. Журавлева, С.Г. Инге-Вечтомов // Генетика. – 2006. – Т. 42. – № 11. – С. 1–13.

6. Григорьев, В.Б. Методы диагностики прионных заболеваний / В.Б. Григорьев, А.Н. Покидышев, С.Л. Кальнов, С.М. Клименко // Вопросы вирусологии. – 2009. – № 5. – С. 4–9.

7. Григорьев, В.Б. Прионные болезни человека и животных / В.Б. Григорьев // Вопросы вирусологии. – 2004. – Т. 6. – С. 4–12.

8. Li, R. Identification of an epitope in the C terminus of normal prion protein whose expression is modulated by binding events in the N terminus / R. Li, T. Liu, B.S. Wong et al. // J. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 301. – P. 567–574.

9. Apetri, A.C. Early Intermediate in Human Prion Protein Folding As Evidenced by Ultrarapid Mixing Experiments / A.C. Apetri, K. Maki, H. Roder, W.K. Surewicz // J. Am. Chem. Soc. – 2006. – Vol. 128. – P. 11673–11678.

ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

SUMMARY

A.Ju. Prosekov, I.S. Miletieva, M.V. Novoselova, E.E. Dragunova

STUDY OF THE QUANTITATIVE CONTENT OF ANIMAL DNA IN SAMPLES OF BIOLOGICAL ORIGIN AND MULTICOMPONENT FORMULATIONS ON THEIR BASIS

Examination of biological material samples were conducted to detect the effectiveness of the DNA isolation and purification quality. The optimum high performance method for isolating animal DNA from samples of biological origin and multicomponent compositions on its basis was selected. The quantitative content of animal DNA in samples of biological origin and multicomponent formulations on their basis was studied.

Protein, identification, diagnosis, infection, prion diseases of humans and animals, molecular and biological studies.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia
Phone/Fax: +7(3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru