

# Wykrywanie pryszczycy z zastosowaniem PCR

Grażyna Paprocka<sup>1</sup>

Andrzej Kęsy<sup>1</sup>

Andrzej Fitzner<sup>1</sup>

Wiesław Niedbalski<sup>1</sup>

Grażyna Płucienniczak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Państwowy Instytut Weterynaryjny

Zduńska Wola

<sup>2</sup>Instytut Biotechnologii i Antybiotyków

Warszawa

## 1. Wstęp

Pryszczycza należy do groźnych chorób zakaźnych zwierząt racicowych o bardzo dużej dynamice szerzenia się. Powoduje poważne straty, a równocześnie jest dużym zagrożeniem w wymianie handlowej zwierzętami i produktami pochodzenia zwierzęcego. Jej czynnikiem etiologicznym jest zjadliwy wirus należący do rodziny *Picornaviridae*, rodzaju *Aphthovirus* o znacznej oporności na wpływy środowiska zewnętrznego (1). Jego materiałem genetycznym jest jednoniciowy RNA o długości 8000 nukleotydów. Głównym białkiem immunogennym wirusa pryszczycy, które powstaje z białka prekursorowego p88 jest VP1 (2).

Wielotypowość i zmienność wirusa jest istotnym elementem utrudniającym zwalczanie choroby. Aktualna sytuacja epizootologiczna świadczy o tym, że pryszczycza stanowi ciągle zagrożenie dla Europy, stąd wynika stała potrzeba doskonalenia metod laboratoryjnego jej rozpoznawania. Obok tradycyjnych metod diagnozowania sytuacja epizootologiczna w zakresie występowania pryszczycy wymaga dysponowania bardziej precyzyjnymi metodami diagnostycznymi. Coraz szersze zastosowanie znajdują techniki biologii molekularnej, m.in. łańcuchowa reakcja polimerazowa (PCR) i sekwencjonowanie fragmentów genomu wirusa (3-8). Na podstawie sekwencji nukleotydów istnieje możliwość analizowania różnic genetycznych między izolatami terenowymi. Porównanie sekwencji nukleotydowych izolatów pozwala na określenie ich pokrewieństwa i pochodzenia. Jest to szczególnie pomocne w przypadku stwierdzenia ogniska choroby i potrzeby ustalenia źródła pochodzenia infekcji. Biorąc to pod uwagę uznano za celowe dokonanie charakterystyki wirusa pryszczycy przy użyciu wybranych technik biologii molekularnej.

## 2. Materiały i metody

### 2.1 Wirus

Materiałem do badań był nabłonek z pęcherzy pryszczycowych pochodzący z kolekcji, który rozdrobniono w PBS (buforowany fosforanami roztwór fizjologiczny), odwirowano przy 4000 obr./min przez 20 minut, a następnie wirowano przy 28 000 obr./min przez 3 godziny w 30% roztworze sacharozy. Testem ELISA wykazano w badanym materiale obecność wirusa pryszczycy typu C (9).

### 2.2. Izolacja RNA

200  $\mu$ l zawiesiny wirusa poddawano działaniu 250  $\mu$ l roztworu D (4 M tioocjanian guanidyny, 25 mM cytrynian sodu, 0,5% sarcosyl, 0,1 M mercaptoetanol), 50  $\mu$ l octanu sodu, 0,5 ml fenolu i 100  $\mu$ l mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy (49:1). Próbkę inkubowano 15 min w łaźni lodowej i wirowano (13 000 obr./min, 15 min). Następnie, 500  $\mu$ l fazy wodnej przenoszono do nowej probówki, dodawano równą objętość izopropanolu i inkubowano w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  przez 1 godz. po czym wirowano (13 000 obr./min, 20 min). Osad rozpuszczano w 300  $\mu$ l roztworu D, dodawano równą objętość izopropanolu i ponownie pozostawiano w  $-20^{\circ}\text{C}$  przez 1 godz. Próbkę wirowano (13 000 obr./min, 20 min), a uzyskany osad przemywano etanolem i suszono.

### 2.3. Startery

Startery zaprojektowano w oparciu na sekwencji genomu wirusa pryszczycy (4). Ich pozycje i sekwencje były następujące:

FM1 22 - /5' - GCGGATCCTGTCACCACCACC - 3' / - 43

FM2 673 - /5' - GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC - 3' / - 694

### 2.4. Synteza cDNA

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono przez 60 min w temp.  $42^{\circ}\text{C}$  przy użyciu odwrotnej transkryptazy AMV (10). Matrycę stanowiło 5  $\mu$ l roztworu RNA otrzymanego w sposób opisany. Koncentracja uzyskanego RNA wynosiła 45  $\mu\text{g/ml}$ , a wartość  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  1,74.

### 2.5. Reakcja PCR

Do amplifikacji cDNA używano 1  $\mu\text{g}$  jednoniciowego cDNA, 3  $\mu$ l 10 mM trifosforanów deoksyrybonukleozydów, po 20 ng starterów FM1 i FM2, 5  $\mu$ l buforu dla polimerazy Taq oraz 2,5 jednostek polimerazy Taq. Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 50  $\mu$ l. Wykonano 30 cykli: 1 min  $96^{\circ}\text{C}$  — denaturacja, 1 min  $56^{\circ}\text{C}$  — wiązanie starterów, 2 min  $72^{\circ}\text{C}$  — wydłużanie łańcucha cDNA. Elongacja w ostatnim cyklu trwała 5 minut.

## 2.6. Analiza produktów amplifikacji

Fragmenty cDNA rozdzielano elektroforetycznie w 6% żelu poliakryloamidowym. Długość fragmentów określano przez porównanie ich ruchliwości elektroforetycznej z ruchliwością wzorcowych fragmentów DNA. Jako wzorca używano hydrolizat DNA plazmidu pUC 19, uzyskany po trawieniu nukleazą restrykcyjną HaeIII i TaqI. Po rozdziale żel wybarwiano w roztworze bromku etydyny o stężeniu 0,5 – 1,0  $\mu\text{M}/\text{ml}$ . Produkty rozdziału obserwowano oświetlając żel lampą UV.

## 2.7. Elucja cDNA z żelu poliakryloamidowego

Po wybarwieniu żelu w bromku etydyny przy świetle UV wycinano pasmo zawierające odpowiedni fragment cDNA. Żel rozdrabniano, zawieszano w buforze do elucji (0,3 M octan sodu, 0,2% SDS, 4 mM EDTA o pH 8,0) i wytrząsano przez noc w temp. 37°C. Po odwirowaniu zawiesiny (15 000 obr./min, przez 10 min) dodawano 1 objętość fenolu o pH 8,0 i 2 krotnie mieszaninę chloroform:alkohol izoamyłowy (24:1), za każdym razem wirując. Do fazy wodnej dodawano 2,5 objętości alkoholu etylowego. Fragment cDNA rozpuszczono w 20  $\mu\text{l}$  buforu TE (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA), a następnie poddano działaniu polimerazy Klenowa i restryktazy BamHI.

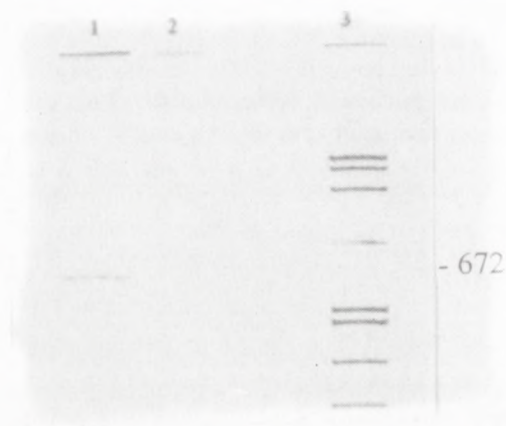
## 2.8. Klonowanie fragmentu cDNA wirusa pryszczycy

### 2.8.1. Ligacja

Do ligacji używano 4  $\mu\text{l}$  wyizolowanego z żelu fragmentu cDNA, 5  $\mu\text{l}$  plazmidowego DNA uprzednio hydrolizowanego nukleazami restrykcyjnymi SmaI i BamHI, 2  $\mu\text{l}$  10x buforu dla T4 DNA ligazy oraz 1  $\mu\text{l}$  ligazy DNA faga T4. Mieszaninę inkubowano przez noc w temp. 16°C.

### 2.8.2. Transformacja

Do 100  $\mu\text{l}$  zawiesiny kompetentnych komórek *E. coli* w temp. 0°C dodawano 10  $\mu\text{l}$  mieszaniny ligacyjnej i inkubowano w łaźni lodowej przez 30 min. Następnie, dodawano 800  $\mu\text{l}$  medium SOC (2% baktotrypton, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 0,05% NaCl, 20 mM glukozy). Zawiesinę inkubowano w temp. pokojowej przez 15 min i wytrząsano przez 1 godz. w temp. 37°C. W celu selekcji transformantów bakterie wysiewano na płytki z podłożem agarowym LB (1% baktotrypton, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 1% NaCl) z dodatkiem 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ampicyliny, 0,1 mM induktora promotora genu lacZ (IPTG) oraz chromoforowego substratu  $\beta$ -galaktozydazy (X-gal). Kolonie, które zawierają plazmid bez wstawki wytwarzają komplementujący fragment  $\beta$ -galaktozydazy i w wyniku wiązania się enzymu z chromoforowym substratem zastępczym X-gal wybarwiają się na kolor niebieski. Kolonie bakterii posiadające wektor z wstawką nie mogą syntetyzować brakującego fragmentu  $\beta$ -galaktozydazy i pozostają nie wybarwione.



Rys. 1. Elektroforeza produktów amplifikacji cDNA w 6% żelu poliakrylamidowym. Ścieżki: 1 — wirus typu C (Zduńska Wola), 2 — kontrola ujemna, 3 — wzorzec DNA z pUC 19.

### 2.9. Izolacja plazmidowego DNA

Do 3 ml pożywki LB przenoszono białą kolonię bakteryjną z płytki agarowej i hodowano bakterie przez 16 godzin w temp. 37°C. Następnie, hodowle wirowano (15 000 obr./min, 2 min). Osad bakterii zawieszano w 200 µl buforu RI (50 mM glukozy, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) i inkubowano 5 min w łaźni lodowej. Po czym w temperaturze 0°C dodawano 400 µl roztworu RII (0,2 N NaOH, 1% SDS), mieszano, dodawano 300 µl roztworu RIII (3 M octan potasu, 1,8 M kwas octowy) i inkubowano 5 minut w łaźni lodowej. Próbkę wirowano (15 000 obr./min, 5 min). Do nowej próbówki nalewano po 480 µl izopropanolu, przenoszono po 800 µl supernatantu i wirowano (15 000 obr./min, 3 min). Do osadu dodawano 200 µl etanolu i wirowano (15 000 obr./min, 2 min). Osad rozpuszczano w 100 µl roztworu RNazy o stężeniu 0,1 mg/ml. Przydatność zrekombinowanych plazmidów do dalszej analizy sprawdzano w 1% żelach agarozowych.

### 2.10. Otrzymywanie jednoniciowego DNA

Pojedyncze kolonie bakteryjne zawierające zrekombinowane plazmidy pBS(+) przenoszono do 3 ml pożywki 2 x YT (1,6% baktotrypton, 1% ekstrakt drożdżowy, 0,5% NaCl z ampicyliną 100 µg/ml). Inkubację prowadzono w temp. 37°C w czasie 1 godziny. Następnie, dodawano 20 µl faga M13KO7 i inkubację kontynuowano 2 godziny z wytrząsaniem. Wówczas gdy hodowla stawała się mętna to dodawano kanamycyny do stężenia 70 µl/ml i hodowano przez 18 godz. w temp. 37°C z wytrząsaniem. Po odwirowaniu hodowli przy 15 000 obr./min przez 10 minut do 1,2 ml supernatantu dodawano 200 µl 20% PEG-u i mieszaninę inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przy 15 000 obr./min przez 5 minut. Osad zawieszano w buforze TE pH 8,0, odbiałczano fenolem i mieszaniną chloroform:alkohol izoamylowy. Fazę wodną wytrącano 1/10 objętości roztworu octanu sodu i 2,5 objętościami etanolu. DNA rozpuszczano w 50 µl H<sub>2</sub>O.

	10	20	30	40	50	60
1	CTGTCAACCAC	CACCGTTGAG	AACTACGGAG	GAGAGACTCA	AGTCCAACGT	CGCCACCACA
	GACAGTGGTG	GTGGCAACTC	TTGATGCCTC	CTCTCTGAGT	TCAGGTTGCA	GCGGTGGTGT
61	CCGACGTTGC	CTTCGTTCCT	GACCGGTTTG	TGAAGGTCAC	AGTGTGGGGT	AACCAACACA
	GGCTGCAACG	GAAGCAAGAA	CTGGCCAAAC	ACTTCCAGTG	TCACAGCCCA	TTGGTTGTGT
121	CACTCGACGT	GATGCAAGCA	CACAAAGACA	ACATCGTGGG	CGCGCTTCTT	CGCCGAGCCA
	GTGAGCTGCA	CTACGTCCGT	GTGTTTCTGT	TGTAGCACCC	GCGCGAAGAA	GCGGCTCGGT
181	CGTACTACTT	TTCTGATTTG	GAAATAGCAG	TGACCCACAC	TGGGAAGCTC	ACATGGGTGC
	GCATGATGAA	AAGACTAAAC	CTTTATCGTC	ACTGGGTGTG	ACCCTTCGAG	TGTACCCACG
241	CCAACGGTGC	ACCAGTTTCT	GCACTTGACA	ACACAACCAA	TCCCACTGCG	TACCACAAGG
	GGTTGCCACG	TGGTCAAAGA	CGTGAAGTGT	TGTGTTGGTT	AGGGTGACGC	ATGGTGTTC
301	GCCCGTTGAC	TCGACTGGCT	CTCCCATACA	CGCGCCACA	CCGTGTGTTG	GCTACGGCGT
	CGGGCAACTG	AGCTGACCGA	GAGGGTATGT	GCGCGGGTGT	GGCACACAAC	CGATGCCGCA
361	ACACTGGCAC	TACGACCTAC	ACCGCCAGAA	CACGCGGGGA	TTCGGCTCAC	CTAACGGCGA
	TGTGACCGTG	ATGCTGGATG	TGGCGGTCTT	GTGCGCCCT	AAGCCGAGTG	GATTGCCGCT
421	CGCATGCTCG	GCATTTGCCA	GCATCGTTCA	ACTTTGGTGC	AGTTAGAGCA	GAAACAATCA
	GCGTACGAGC	CGTAAACGGT	CGTAGCAAGT	TGAAACCACG	TCAATCTCGT	CTTTGTTAGT
481	CTGAGTTGCT	CGTGCGCATG	AAGCGTGCTG	AACTCTATTG	TCCTAGGCCG	ATTCTTCCGA
	GACTCAACGA	GCACGCGTAC	TTCGCACGAC	TTGAGATAAC	AGGATCCGGC	TAAGAAGGCT
541	TTCAGCCAAC	GGGTGATAGA	CACAAGCAAC	CGCTCGTCGC	ACCTGCAAAA	CAACTGCTGA
	AAGTCGGTTG	CCCCTATCT	GTGTTTCGTTG	GCGAGCAGCG	TGGACGTTTT	GTTGACGACT
601	ACTTTGACCT	GCTCAAGTTG	GCTGGAGAT			
	TGAAACTGGA	CGAGTTCAAC	CGACCTCTA			

Rys. 2. Sekwencja nukleotydów fragmentu cDNA kodującego region VP1 wirusa pryszczycy typu C (Zduńska Wola).

## 2.11. Sekwencjonowanie DNA

Sekwencję nukleotydową sklonowanego fragmentu oznaczono metodą Sanger (12), używając DNA polimerazy Taq oraz [ $\alpha^{32}$ P]dCTP. Elektroforezę wykonywano w żelach o długości 40 cm i grubości 0,2 - 0,4 mm przy użyciu buforu TBE (89 mM Tris-HCl, 89 mM kwas borowy, 2 mM EDTA). Autoradiografię prowadzono w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  (10).

## 3. Omówienie wyników

Materiałem do badań był nabłonek z pęcherzy pryszczycowych. Izolację RNA wykonano w oparciu na metodzie Chomczyńskiego (11). Na matrycy wirusowego RNA w reakcji katalizowanej przez odwrotną transkryptazę otrzymano cDNA. Do powielania metodą PCR wybrano region głównego immuno-

FMDVC3	-	VTTTVENYGGGETQVQRRHHTDVAFLDRFVKVTVSGNQHTLDVMOAH	-47
FMDV01	-	ADPVTTTVENYGGGETQIQRRQHTDVSFIMDRFVKVTPQNGINILDLMQIP	-50
FMDVC3	-	KDNIVGALLRRATYYFSDLEIAVTHGTGKLTWVPNGAPVSAKDNTTNPATY	-97
		.	
FMDV01	-	SHTLVGALLRASTYYFSDLEIAVKHEGDLTWVPNGAPEKALDNTTNPATY	-100
FMDVC3	-	HKGPLTRLALPYTAPHRVLATAYTGTTTTYA----RTRGDSAHLTATHAR	-143
FMDV01	-	HKAPLTRLALPYTAPHRVLATVYNGECRYSRNAVPNRGRDGLQMLAQKVAR	-150
FMDVC3	-	HLPASFNFGAVRAETITELLVRMKRAELYCPRPILPIQPTGDRHKQPLVA	-193
		.	
FMDV01	-	TLPTSFNYGAIKATRVTEVLYRMKRAETYCPRPLLAIHPTEARHKQKIVA	-200
FMDVC3	-	PAKQLLNFDLLKLAGD	-209
FMDV01	-	PVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPF	-224

Rys. 3. Porównanie sekwencji aminokwasów regionu białka VP1 wirusa pryszczycy typu C i O (Zduńska Wola). | — aminokwasy identyczne, • — aminokwasy podobne.

genne białka VP1 wirusa pryszczycy, zawarty między 22 a 694 pz. W analizie wykonanej przy użyciu systemu do dokumentacji żeli wykazano istnienie prążka położonego w obszarze 672 pz markera. Przy kontroli negatywnej nie powstały wykrywalne zastosowanymi metodami analizy produkty (rys. 1). Technika PCR okazała się szybką, czułą i niezbyt skomplikowaną w wykonaniu metodą identyfikacji RNA wirusa pryszczycy bezpośrednio z materiałów klinicznych. Badany fragment cDNA sklonowano w wektorze plazmidowym pBS(+). W celu otrzymania jednoniciowej formy DNA do sekwencjonowania, szczepki bakteryjne infekowano bakteriofagiem M13 KO7.

Jednoniciowa forma DNA posłużyła do ustalenia sekwencji nukleotydów badanego fragmentu metodą Sangera (12), przy zastosowaniu polimerazy Taq (rys. 2). Sekwencję analizowano na komputerze w oparciu na programie PC/GENE. Odczytaną sekwencję aminokwasów fragmentu białka VP1 wirusa pryszczycy typu C porównano z wcześniej określoną sekwencją wirusa typu O (13) (rys. 3). W porównywanych serotypach wykazano 146 (68,86%) identycznych i 18 (8,61%) podobnych aminokwasów. Region wysoce homologiczny znajduje się między 104 a 121 aminokwasem. Po nim występuje fragment o dużej zmienności, przy czym w pozycji 141-143 u obu serotypów znajduje się sekwencja RGD (ArgGlyAsp) odpowiedzialna za rozpoznawanie przez wirus pryszczycy receptorów na powierzchni komórek.

Zastosowane w pracy techniki biologii molekularnej okazały się przydatne do szybkiego rozpoznawania wirusa pryszczycy w materiale biologicznym i stały się atrakcyjnym uzupełnieniem klasycznych metod, stanowiąc istotny postęp w diagnostyce choroby.

## Literatura

1. Larski Z., Truszczyński M., (1992), *Zarys mikrobiologii weterynaryjnej*, ART, Olsztyn.
2. Beck E., Forss S., Strebel K., Cattaneo R., Feil G., (1983), *Nucleic Acids Res.*, 11, 7873-7885.
3. Beck E., Feil G., Strohmaier K., (1983), *The EMBO Journal*, 2, 555-559.
4. Beck E., Strohmaier K., (1987), *J. Virol.*, 61, 1621-1629.
5. Carroll A. R., Rowlands D. J., Clarke B. E., (1984), *Nucleic Acids Res.*, 12, 2461-2472.
6. Cheung A., DeLamarter J., Weiss S., Kupper H., (1983), *J. Virol.*, 2, 451-459.
7. Forss S., Strebel K., Beck E., Schaller H., (1984), *Nucleic Acids Res.*, 12, 6587-6601.
8. Makoff A. J., Paynter C. A., Rowlands D. J., Boothroyd J. C., (1982), *Nucleic Acids Res.*, 10, 8285-8295.
9. Paprocka G., Kęsy A., Niedbalski W., Fitzner A., (1997), *Biotechnologia*, 1(36), 131-137.
10. Maniatis T., Fritsch E.F., Samrook J., (1982), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
11. Chomczyński P., Sacchi N., (1987), *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
12. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 5463-5465.
13. Paprocka G., Kęsy A., Niedbalski W., Fitzner A., (1996), *Medycyna Wet.*, 2, 111-113.

## Application of PCR for the detection of FMD viral RNA

## Summary

The polymerase chain reaction (PCR) method has been applied to the detection of FMD viral RNA in samples taken during the clinical stage of FMD from calf. Total RNA was extracted with guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method and reversely transcribed using AMV-reverse transcriptase. cDNA was used as a template for the amplification by PCR of the 672 bp of the VP1 coding sequence. The amplified fragment of cDNA was cloned in the phagemid pBS(+). The first DNA strand was sequenced and consistently an amino acid sequence was established. Comparison between VP1 amino acid sequence of FMDV types C and earlier described type O was performed.

**Key words:**

(FMDV) foot-and-mouth disease virus, PCR, amino acid sequence.

*Adres do korespondencji:*

Grażyna Paprocka, Zakład Pryszczycy, Państwowy Instytut Weterynaryjny, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola.