Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Современные методы выявления и типирования патогенов: микрочипы, секвенирование

Забережный Алексей Дмитриевич

доктор биологических наук, заведующий лабораторией прикладной вирусологии и биотехнологии

Научно-методическая конференция "Анализ и контроль качества продукции"

Одинцовский район, 27-31 октября 2008 г.

Молекулярными методами в биологии часто считают методы, основанные на работе с нуклеиновыми кислотами -

ДНК и РНК

Стремительный рост молекулярных методов

1979 – начало анализа первичной структуры генов

1980 – за 1 ген дают ученую степень

1990 – начало ПЦР

1995 – полный вирусный геном – событие, все журналы принимают к публикации

1997 – появились инфекционные ДНК- клоны вирусов

2000-2005 – включились суперкомпьютеры

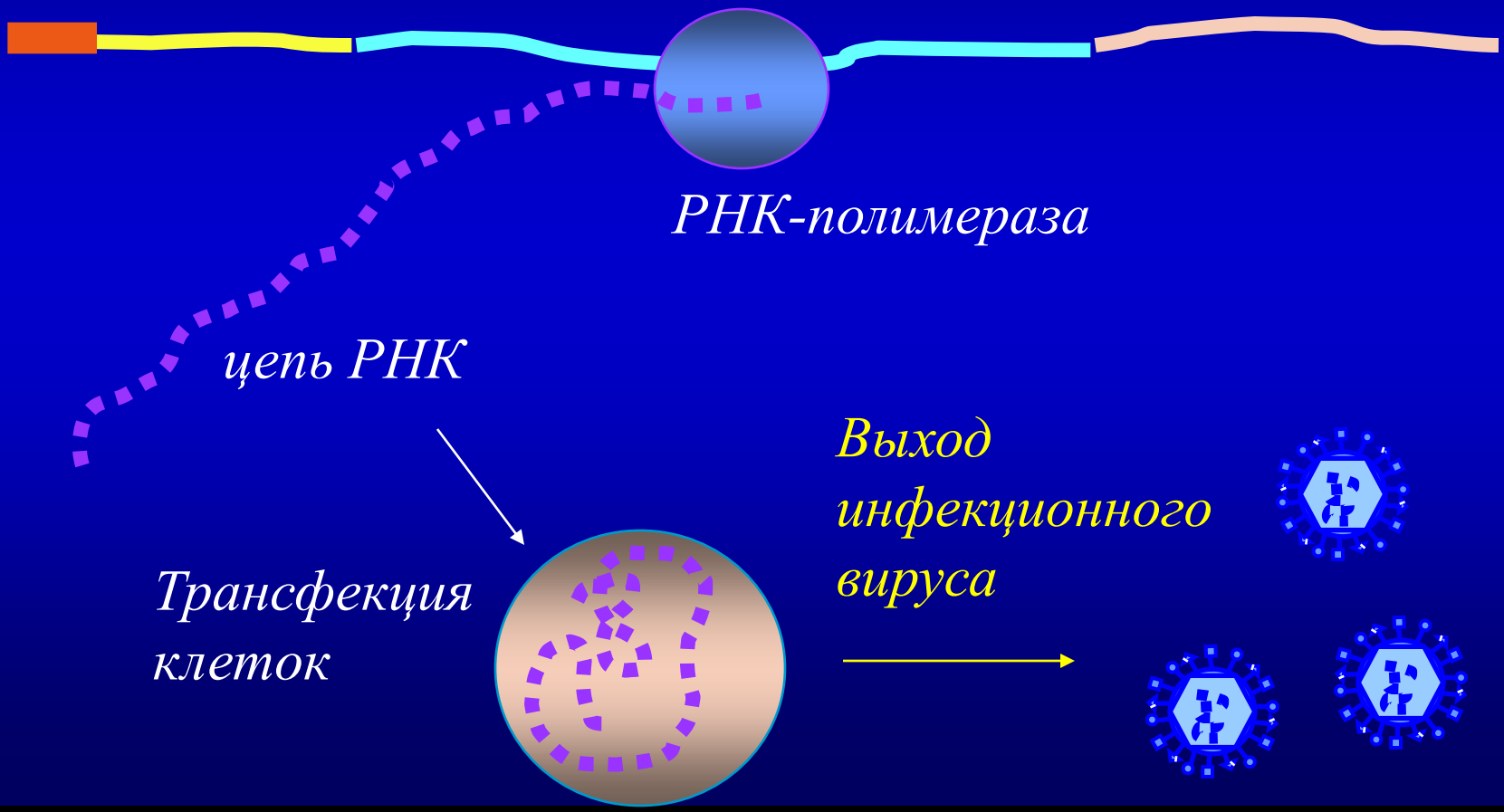
2005 - Хорек, зараженный маркированным вирусом, светится зеленым светом в ультрафиолетовых лучах, видно распределение вируса в органах и тканях

Обратная генетика Reverse genetics

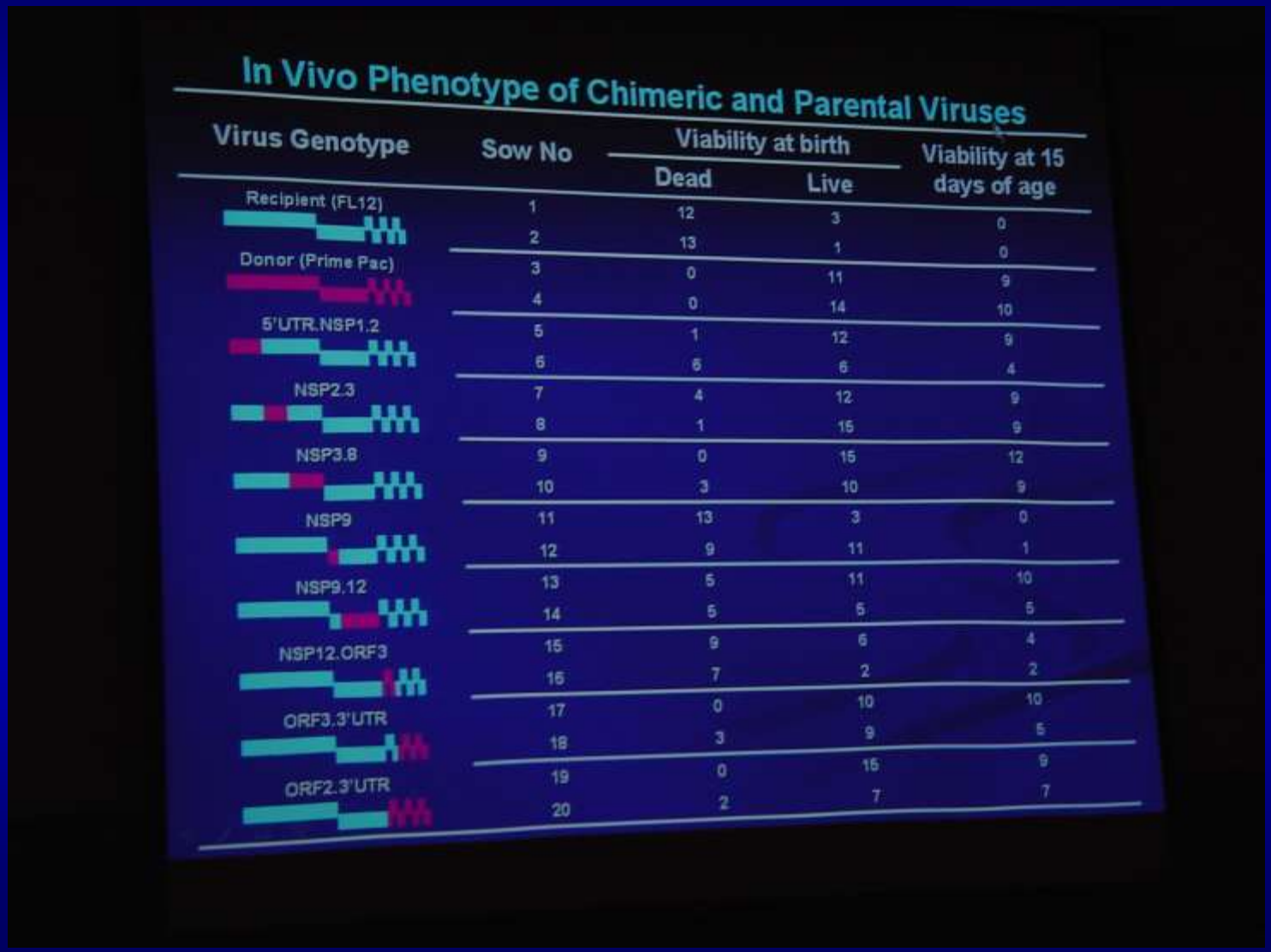
Обратная генетика - это раздел молекулярной генетики, посвященный *воссозданию, конструированию* функционального генетического материала.

Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Получение РНК-копии вирусного генома



Американское общество вирусологии 2005



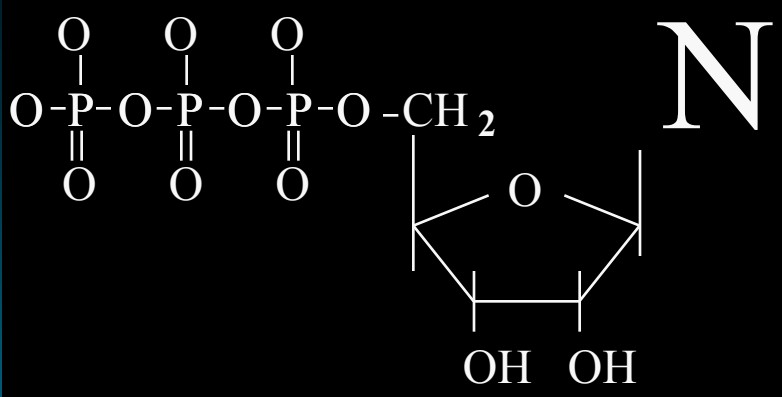
In Vivo Phenotype of Chimeric and Parental Viruses

Virus Genotype	Sow No	Viability at birth		Viability at 15 days of age
		Dead	Live	
Recipient (FL12)	1	12	3	0
	2	13	1	0
Donor (Prime Pac)	3	0	11	9
	4	0	14	10
5'UTR.NSP1.2	5	1	12	9
	6	6	6	4
NSP2.3	7	4	12	9
	8	1	15	9
NSP3.8	9	0	15	12
	10	3	10	9
NSP9	11	13	3	0
	12	9	11	1
NSP9.12	13	5	11	10
	14	5	5	5
NSP12.ORF3	15	9	6	4
	16	7	2	2
ORF3.3'UTR	17	0	10	10
	18	3	9	5
ORF2.3'UTR	19	0	15	9
	20	2	7	7

Молекулярная диагностика основана на поиске и анализе ДНК и РНК

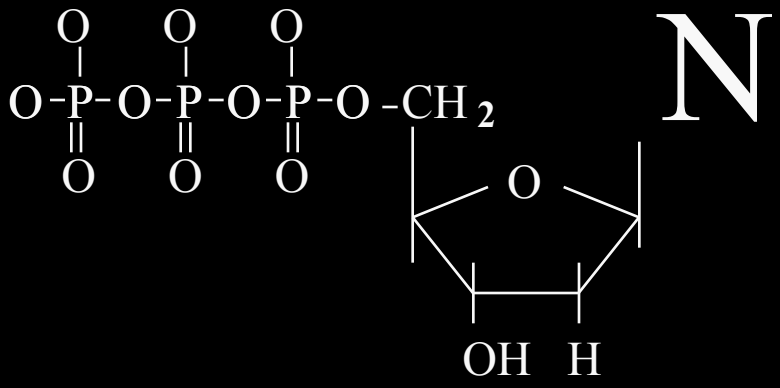
Эволюционное развитие методов молекулярной диагностики

- ДНК-ДНК гибридизация
- Метод полимеразной цепной реакции
  - Обычный
  - С обратной транскрипцией
  - Гнездовой
  - Множественный
  - С флуоресцентной меткой
  - С внутренним контролем
- ПЦР в реальном времени – диагностика нового поколения
- Секвенирование
- Технология микрочипов



рибоза

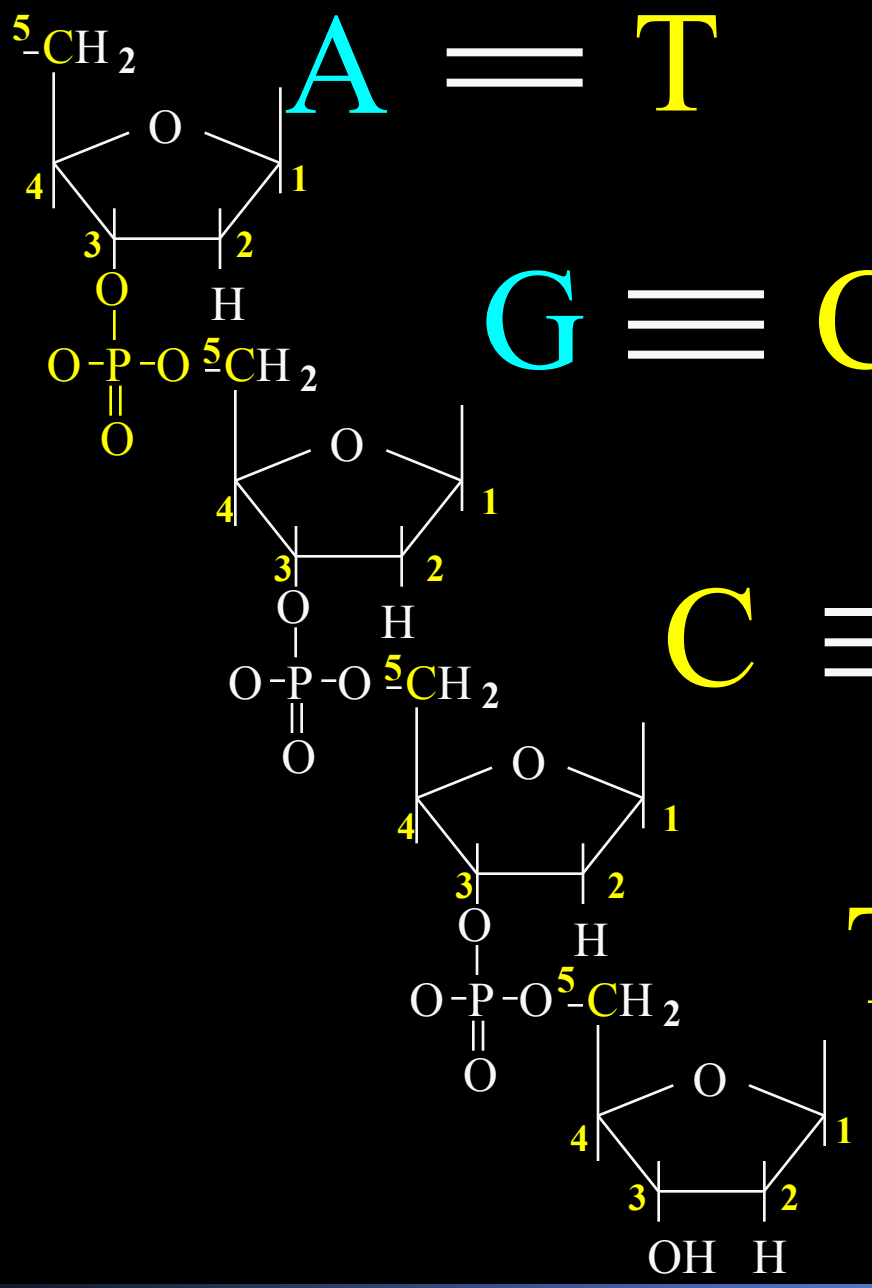
- Аденозин
- Гуанидин
- Цитозин
- Урацил



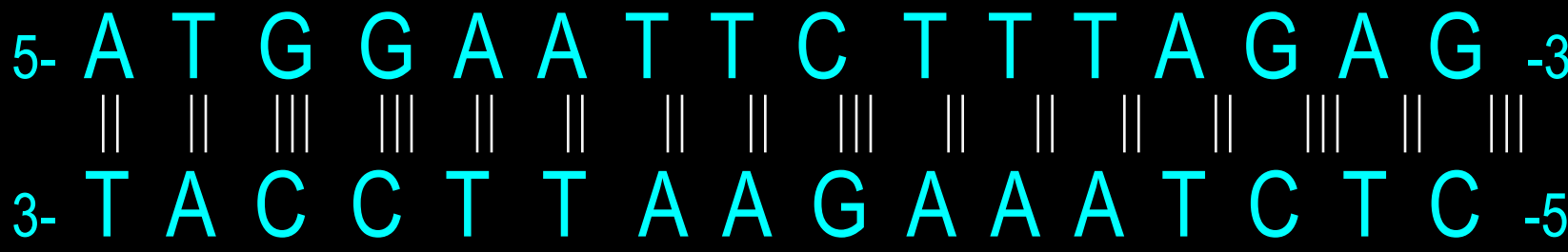
дезоксирибоза

- Аденозин
- Гуанидин
- Цитозин
- Тимидин

Компоненты РНК и ДНК



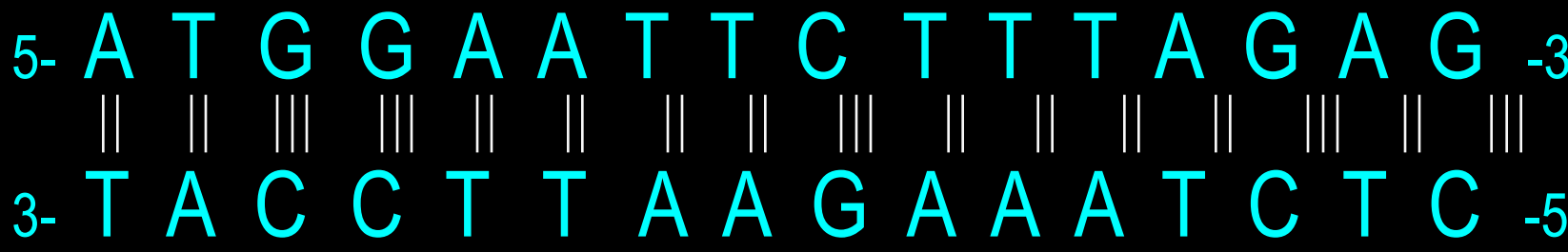
Строение двойной цепи ДНК


5- A T G G A A T T C T T T A G A G -3
3- T A C C T T A A G A A A T C T C -5

5- A T G G A A T T C T T T A G A G -3

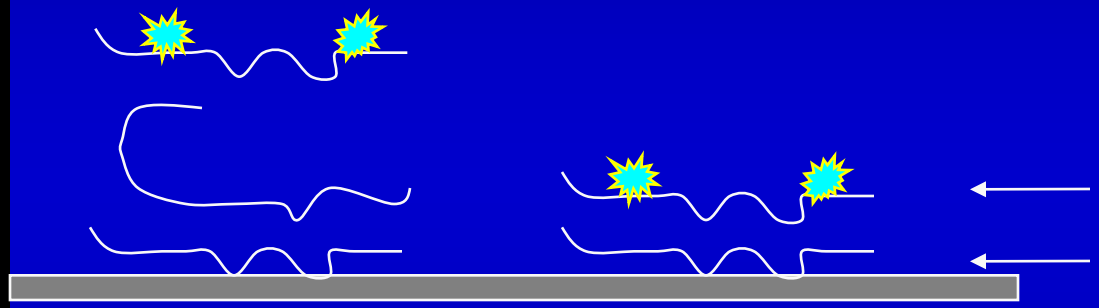
$95^{o}C$

3- T A C C T T A A G A A A T C T C -5


5- A T G G A A T T C T T T A G A G -3
3- T A C C T T A A G A A A T C T C -5

Метод ДНК-ДНК гибридизации

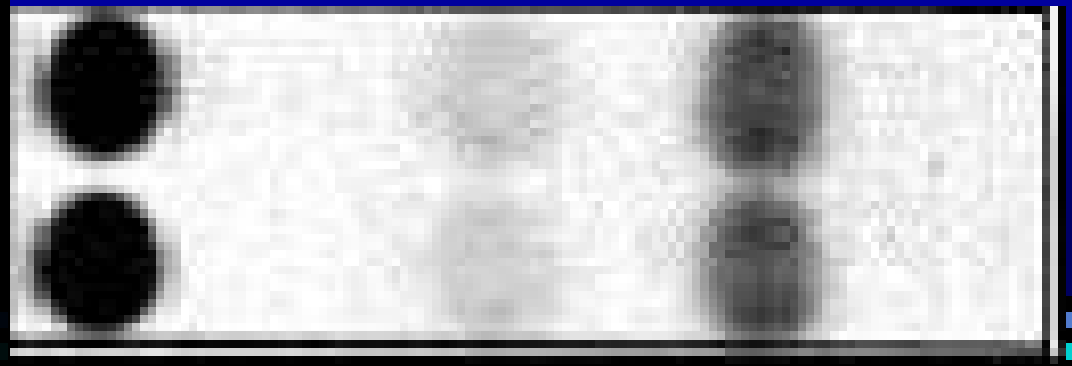
^{32}P ^{35}S



Меченый ДНК -зонд

ДНК в пробе

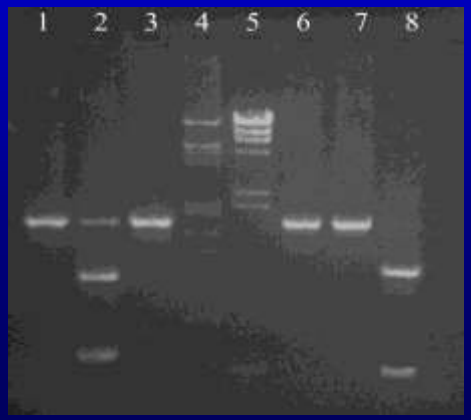
Нейлоновая мембрана



1984 г.

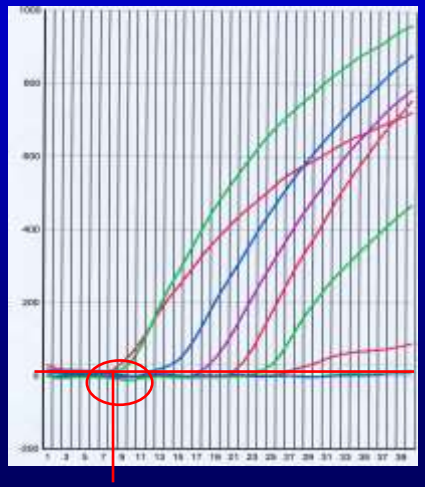
•Метод полимеразной цепной реакции

- •Обычный
- •С обратной транскрипцией
- •Гнездовой
- •Множественный
- •С внутренним контролем
- •С флуоресцентной меткой



Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

«ПЦР в реальном времени»



Прибор ABI Prism 7000(Applied Biosystems) для выполнения анализов методом ПЦР в реальном времени.

Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Технология микрочипов (биочипов).

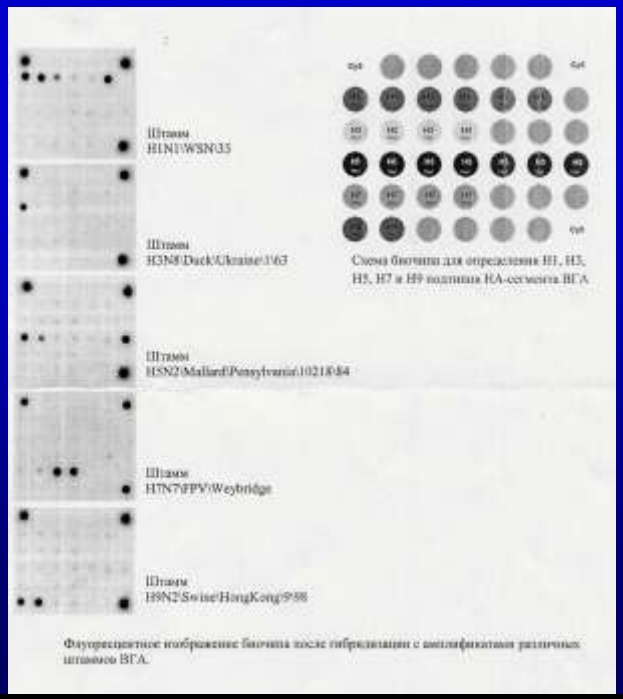


Схема биочипа для определения H1, H3, H5, H7 и H9 подтипов НА-сегмента ВГА

Флуоресцентное изображение биочипа после гибридизации с амплификатами различных штаммов ВГА.

ПЦР

↓

гибридизация

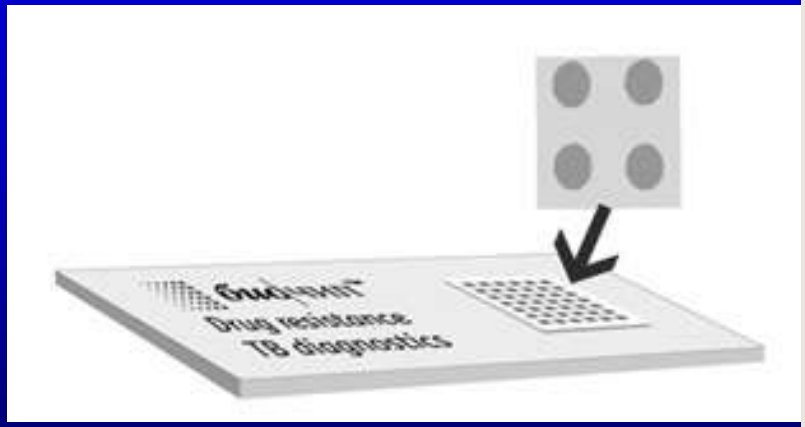
↓

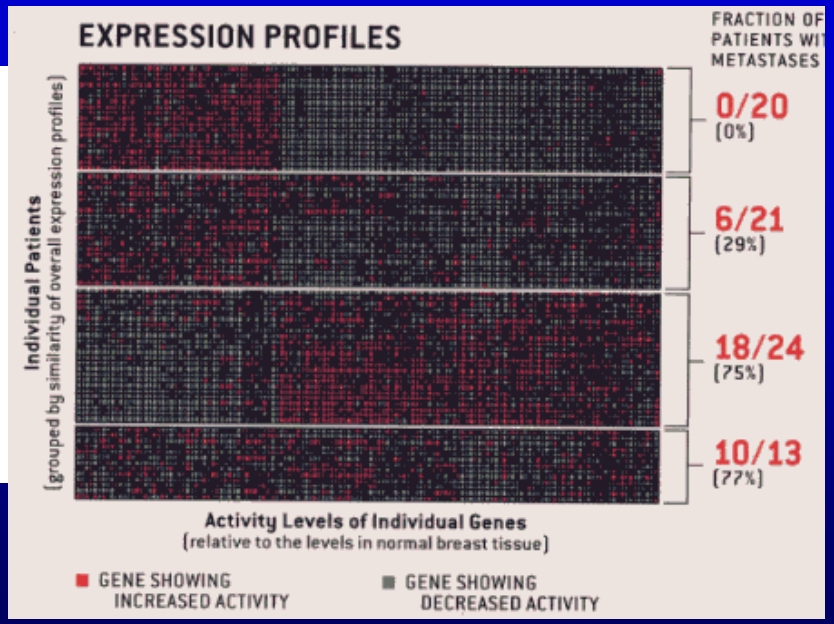
детекция

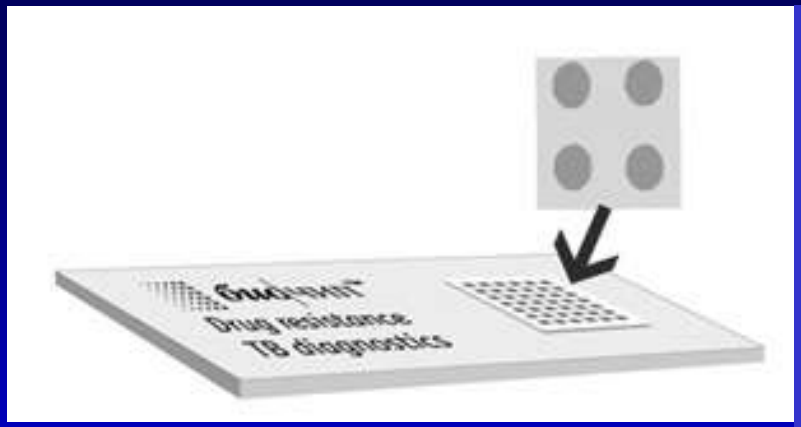
Технология микрочипов (биочипов).

Специальный биочип «Отпечаток пальцев»

Человек Струйный принтер Оборудовпание для микроэлектроники



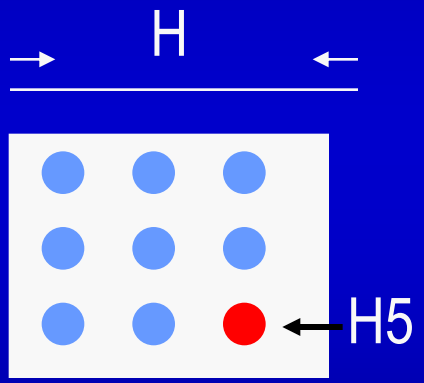




Технология микрочипов
«Дизайнерский тип»
(десятки пятен)

Грипп А - 16 подтипов гемагглютинина (H)

и 9 подтипов нейраминидазы



Dichelobacter nodosus – 9 серогрупп и 19 сероваров

Leptospira interrogans

Mycobacterium bovis

Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Грипп в Новосибирске

В середине июля 2005 года в ряде населенных пунктов Новосибирской области отмечались случаи заболевания среди домашних птиц (утки, куры) с летальностью свыше 90%.

Был осуществлен сбор биологического материала от павших, больных и контактировавших с ними клинически здоровых уток и кур, а также от клинически здоровых диких птиц.

Полевой материал исследовали с помощью ПЦР и ПЦР в реальном времени, РТГА и микрочипами. Нуклеиновые кислоты из положительных образцов были секвенированы.

Технология микрочипов (биочипов)

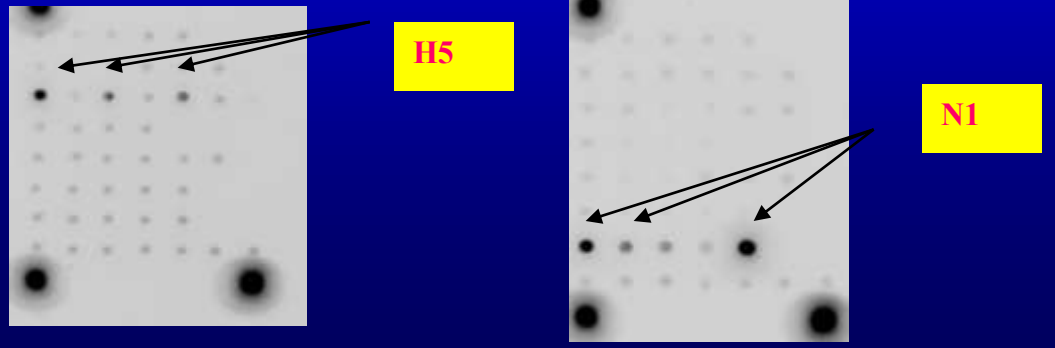
1 микрочип =17 реакциям ПЦР

К							
H1	H1	H1	H1	H2	H2	H2	
H3	H3	H3	H3	H3	H3	H4	
H5	H5	H5	H5	H5	H5	H6	
H7	H7	H7	H7	H7	H8		
H9	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15
N1	N1	N1	N1	N1	Kr		
N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	
К							К

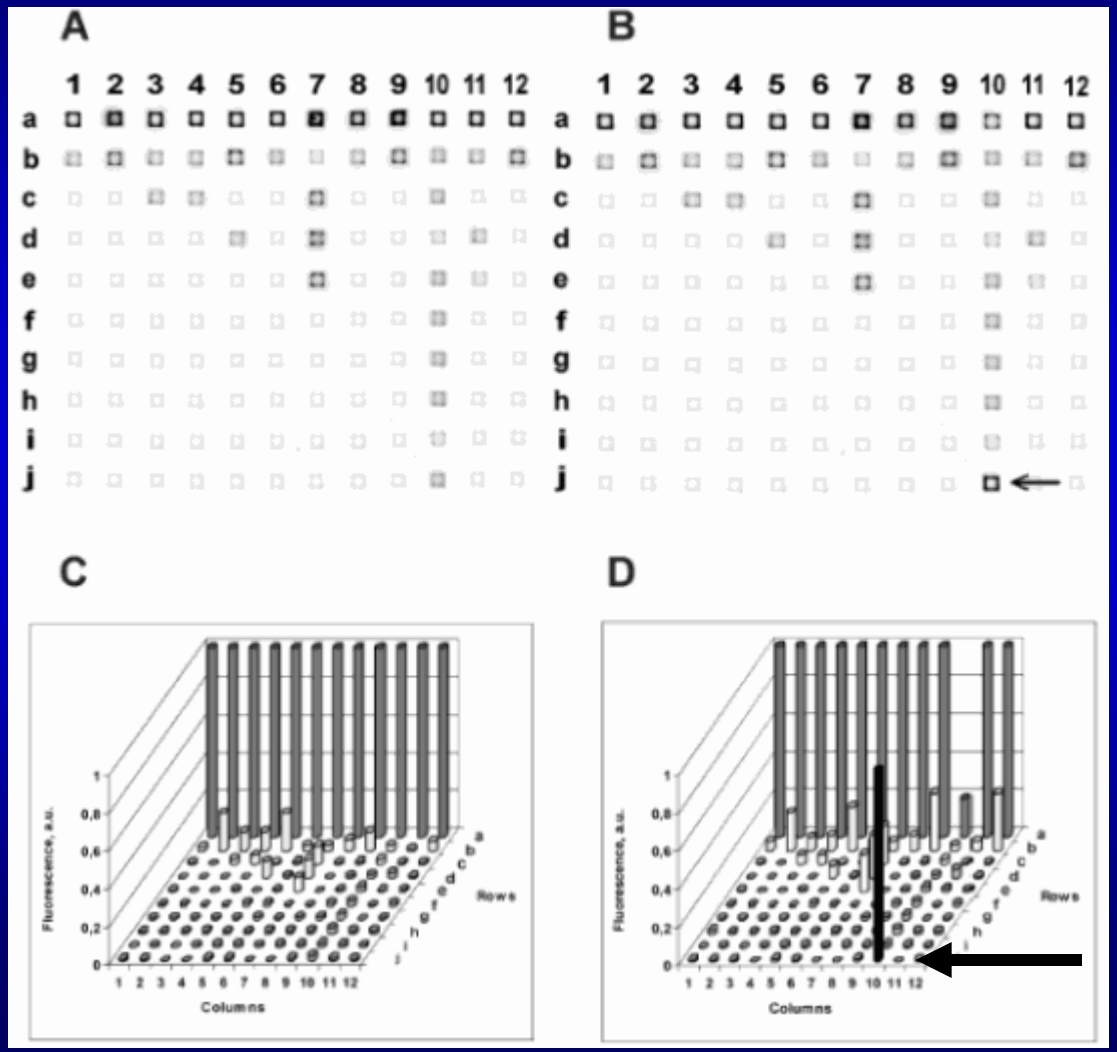
Схема микрочипа для типирования вируса гриппа А

Данный микрочип позволяет типировать вирус гриппа А по 15 подтипам гена НА и 2 подтипам гена NA. Он разработан совместно с НИИ молекулярной биологии им. Энгельгарта.

Типирование образцов из Новосибирска



Определение устойчивости M.tuberculosis к рифампицину



His 526 >Tyr

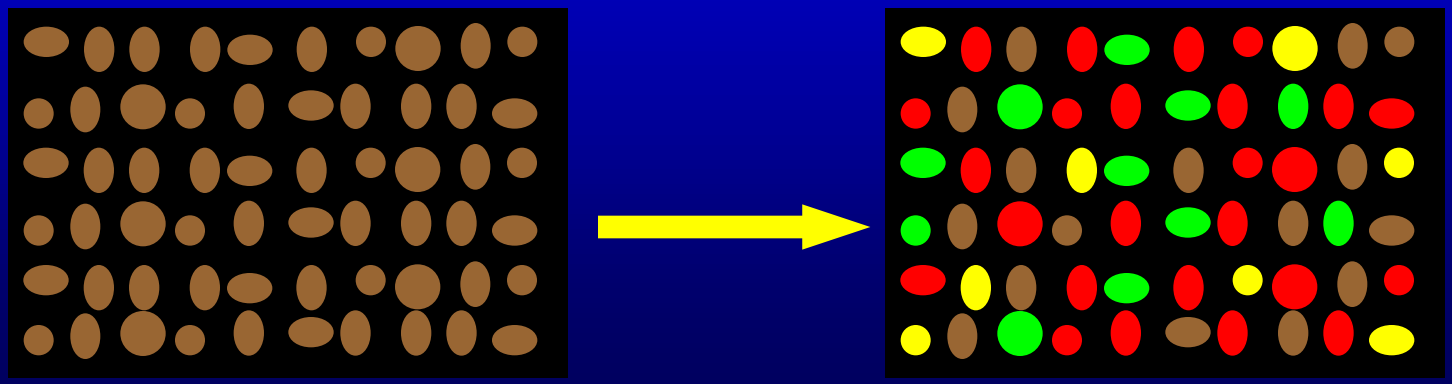
Технология микрочипов (биочипов)

«Тотальный тип» (сотни –тысячи пятен)

мРНК – кДНК первой особи (культуры клеток и.т.д.)

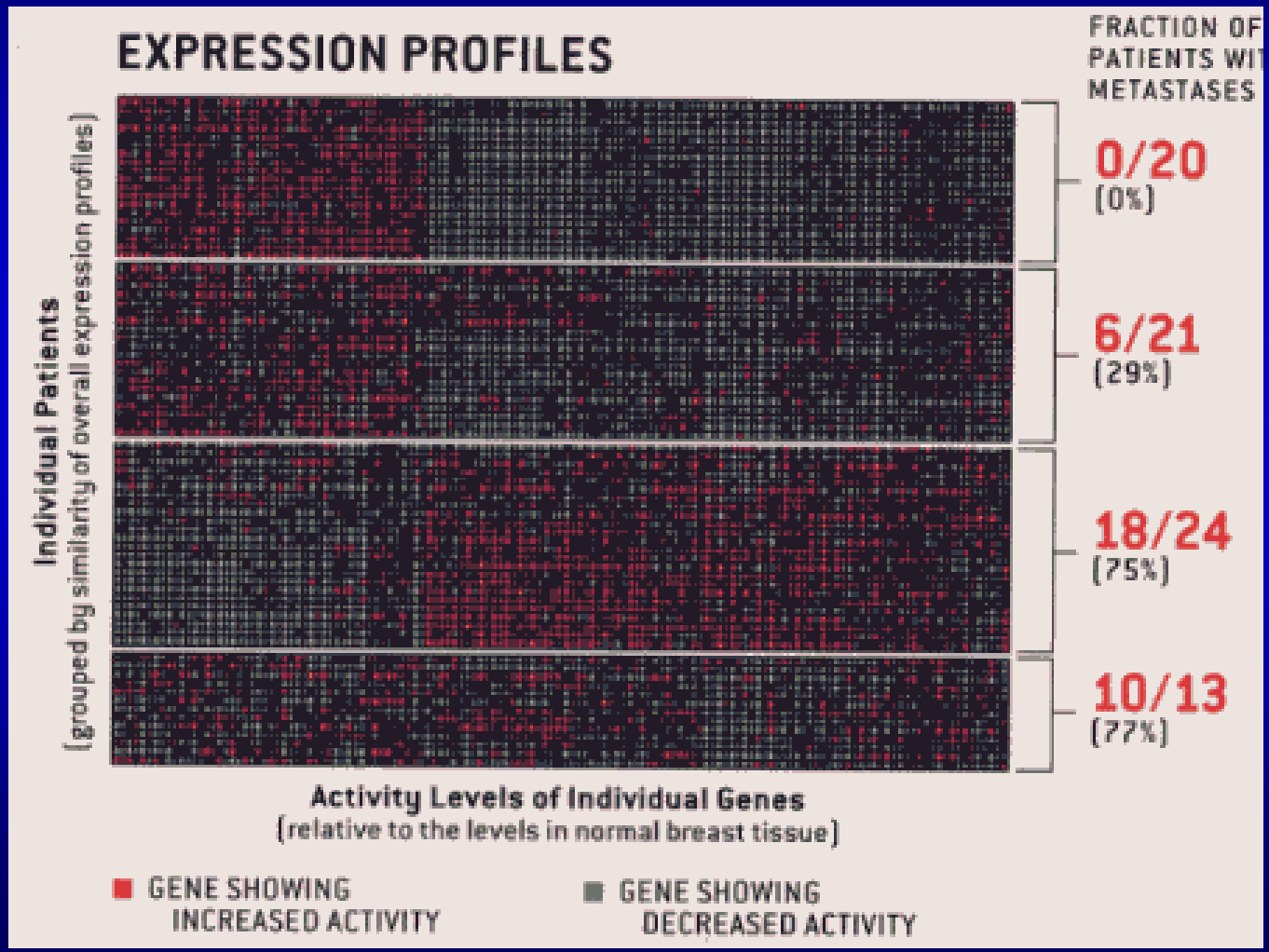
мРНК – кДНК второй особи

Фрагменты индивидуальных генов животного



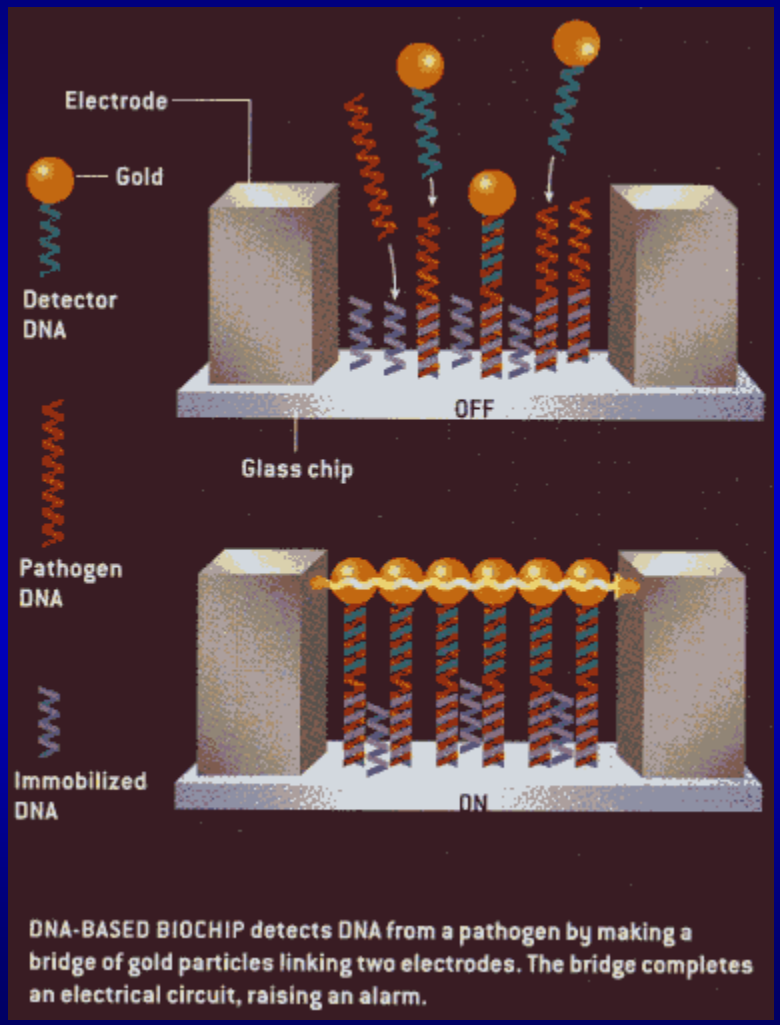
Технология микрочипов (биочипов)

«Отпечатки пальцев» (тысячи-миллионы пятен)



Технология микрочипов (биочипов)

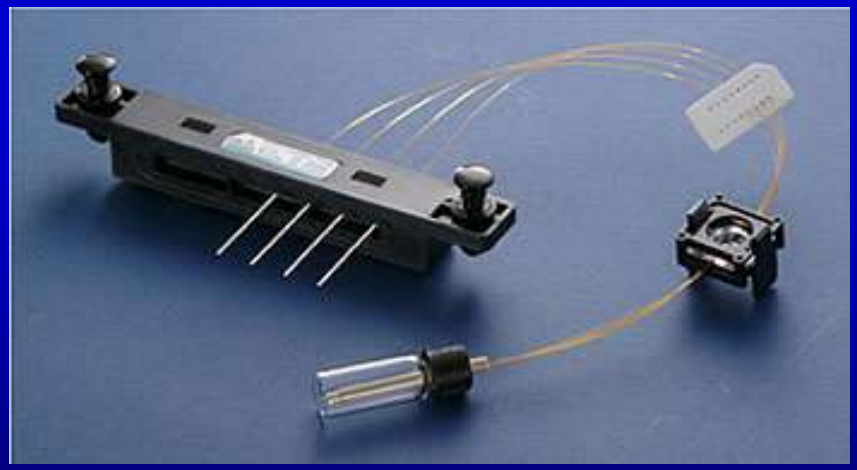
Модификации считывания



DNA-BASED BIOCHIP detects DNA from a pathogen by making a bridge of gold particles linking two electrodes. The bridge completes an electrical circuit, raising an alarm.

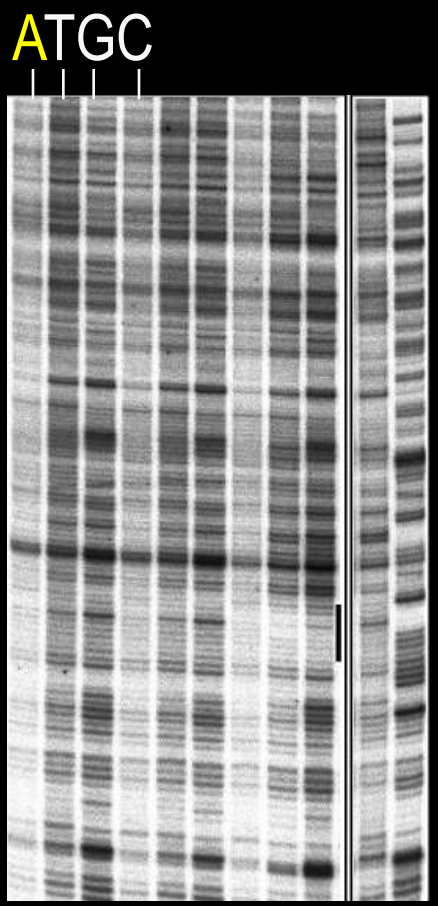
Секвенирование

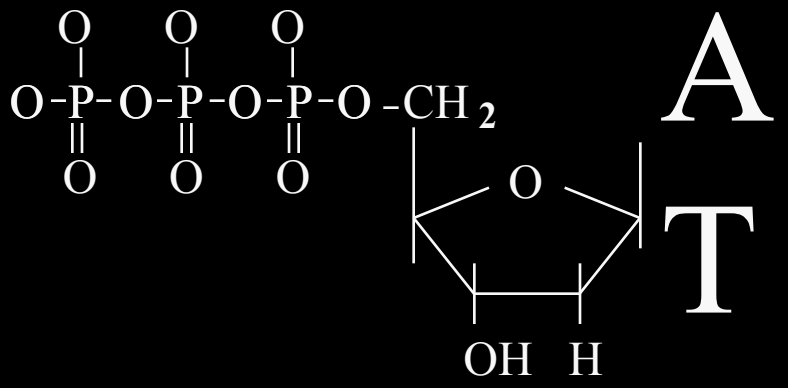
Новые возможности в диагностике

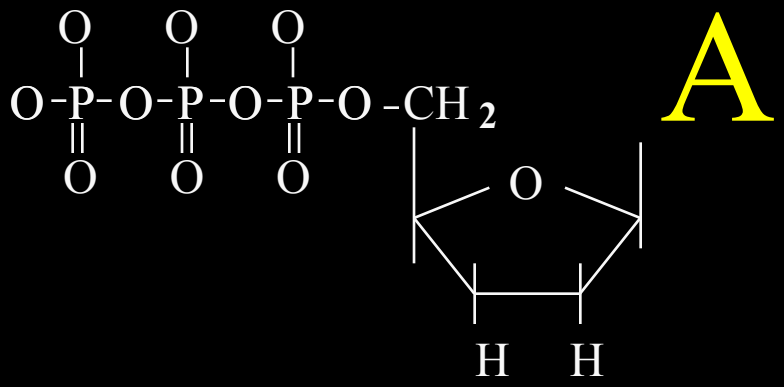


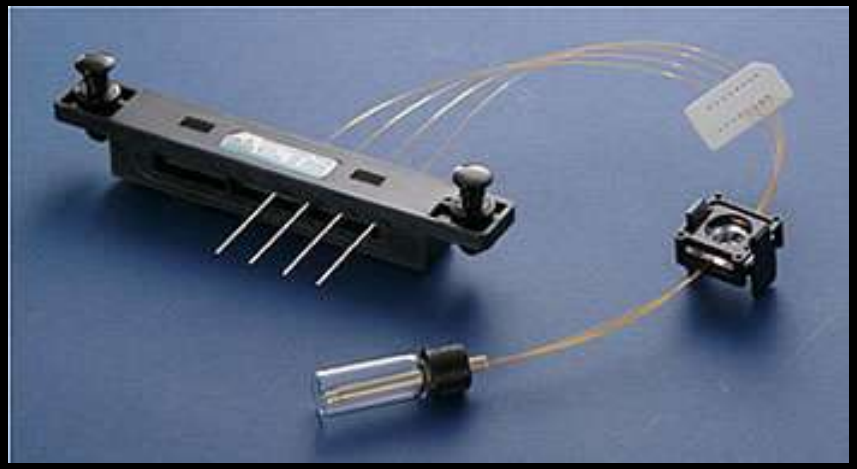
АТГЦАТГЦ

Начало секвенирования

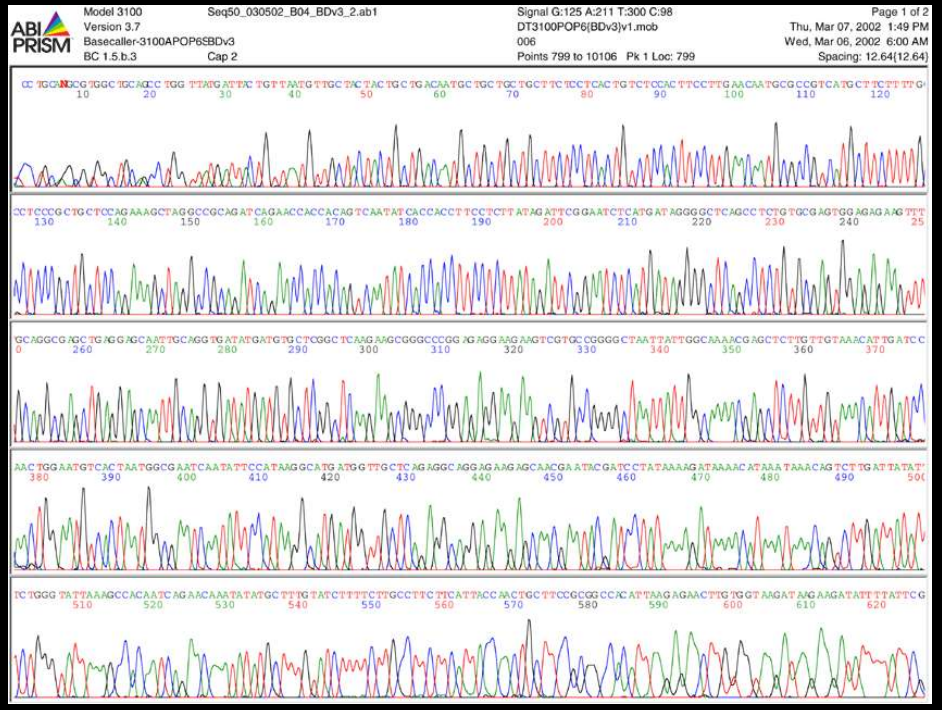




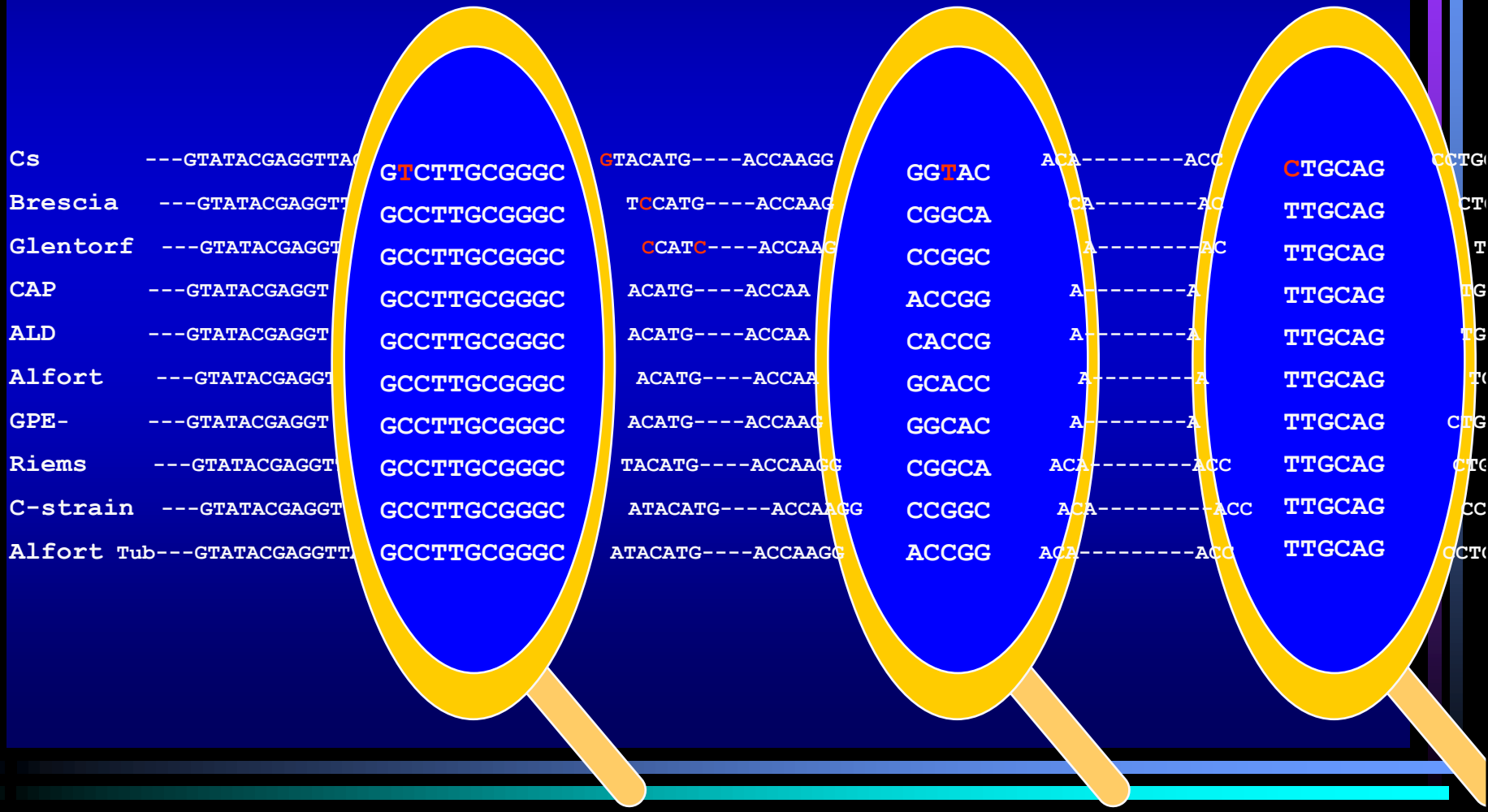




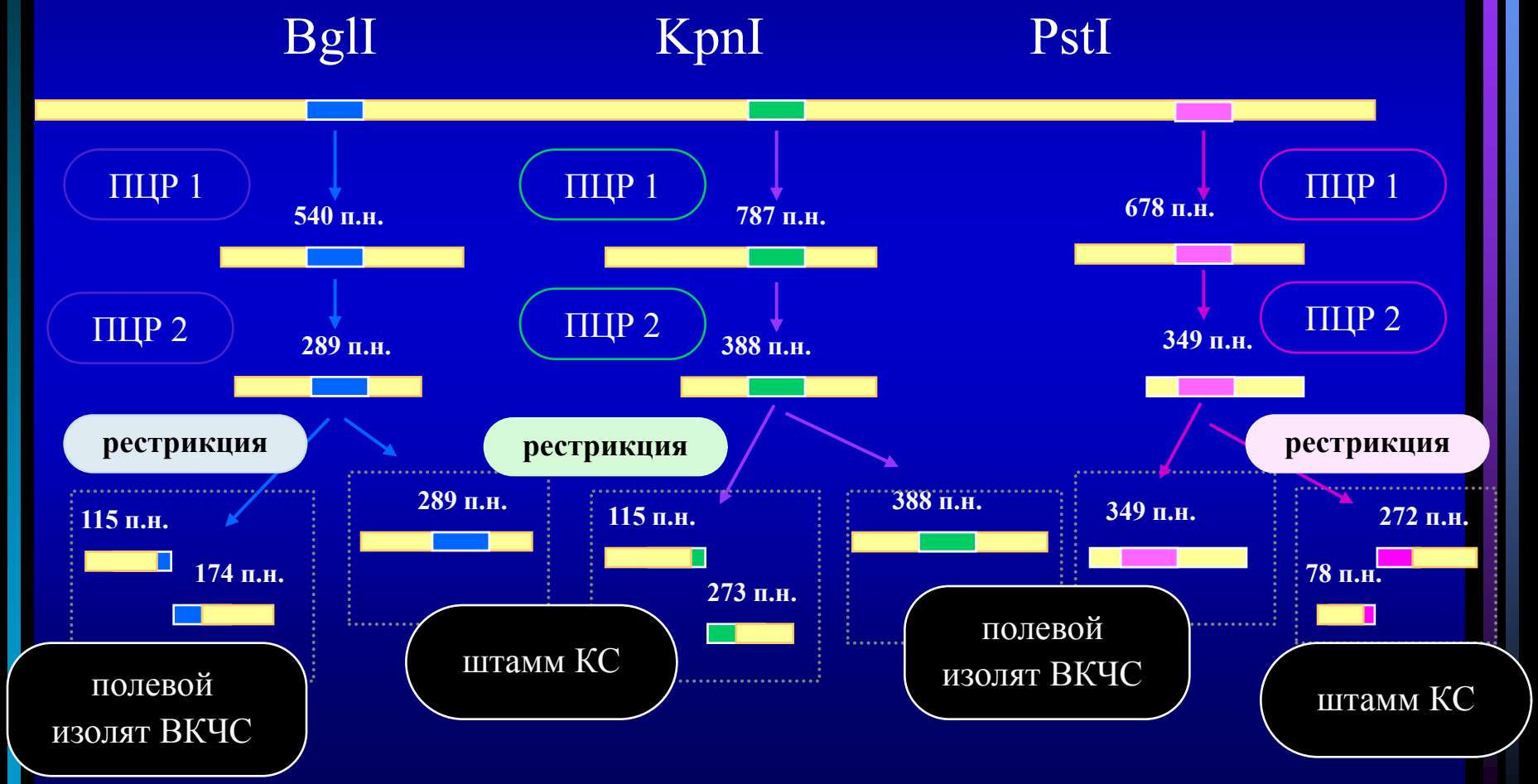
Развитие секвенирования



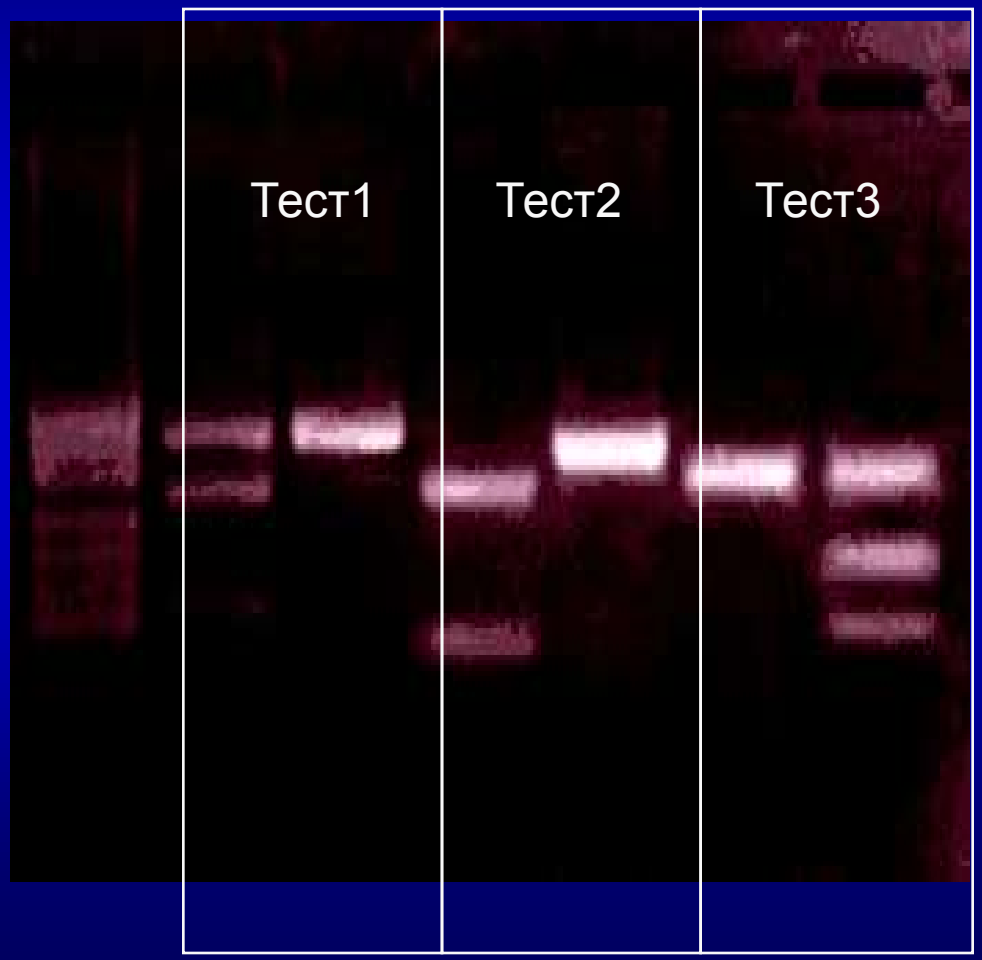
Структура геномов вируса классической чумы свиней



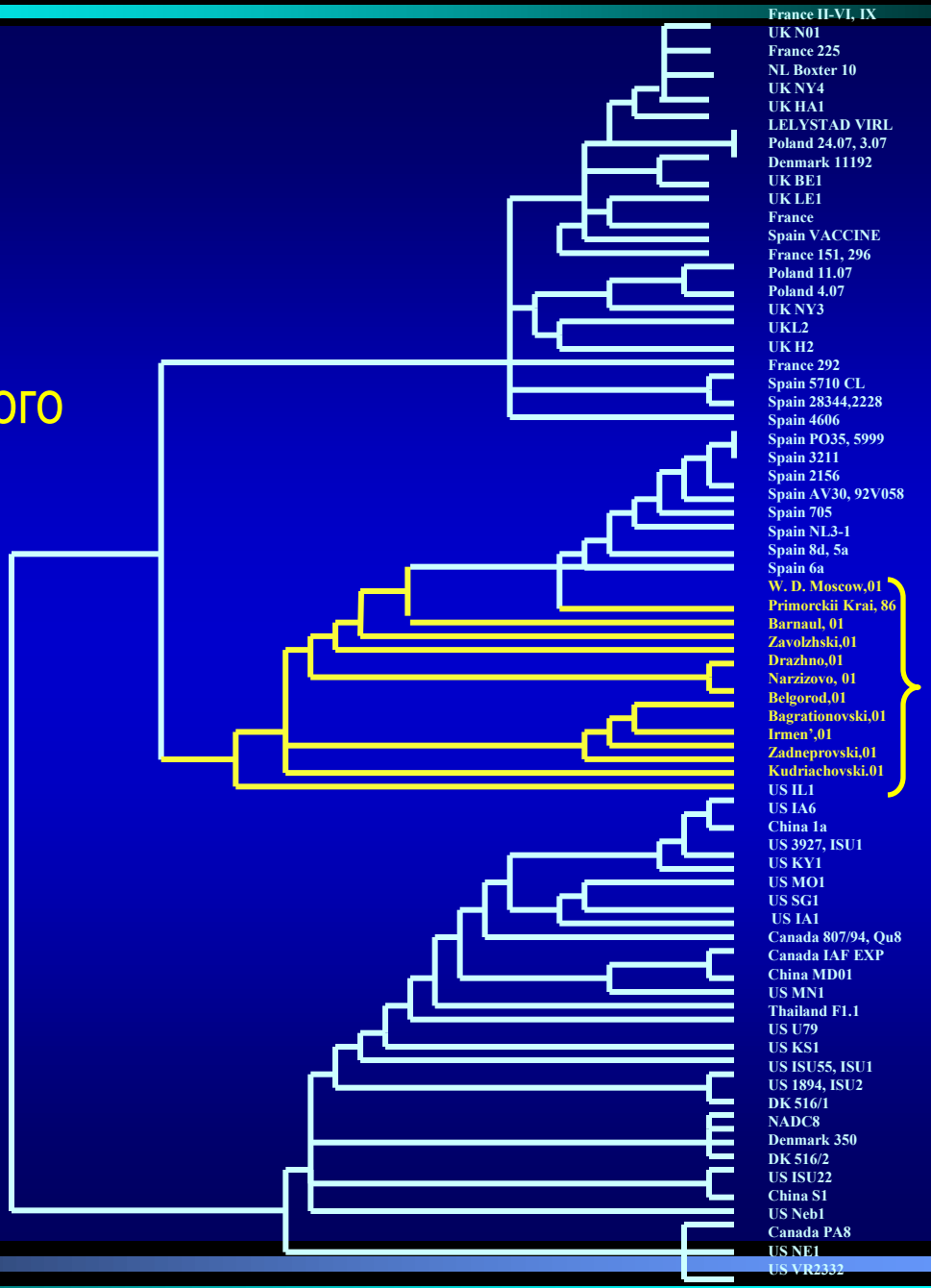
Дифференциация вакцинного вируса КЧС от полевых изолятов.



Дифференциация вакцинного вируса КЧС от полевых изолятов.



Анализ филогенетического родства изолятов вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (РРСС)



Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Отдел прикладной вирусологии и иммунологии

лаборатории

- Средств специфической профилактики вирусных болезней
- Молекулярной диагностики
- Прикладной вирусологии и биотехнологии

Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Международное сотрудничество

Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

НАРВАК

Сотрудничество с научными центрами США

- *ARS, USDA: National Animal Disease Center, Ames, Iowa*
- *ARS, USDA: Plum Island Animal Disease Center, New York, NY*
- *ARS, USDA: Poultry Disease and Oncology Laboratory, East Lansing, Michigan*
- *ARS, USDA: South East Poultry Research Laboratory, Athens, Georgia.*
- *ARS, USDA: Animal Disease Research Unit, Pullman, Washington.*

Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Сотрудничество с научными центрами Европы

Trevor Drew	Central Veterinary laboratory Weybridge UK
Luis Enjuanes	University of Madrid, Spain
Rob Vanherwijnen	European Veterinary laboratory, Amsterdam, Netherlands
Irene Greizer-Wilke	Hannover Veterinary School, Germany
Florence Cliquet	Nancy Reference Lab for Rabies, France

Спасибо за внимание