

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**



**ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА АФРИКАНСЬКОЇ ЧУМИ
СВИНЕЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ МЕТОДАМИ ТА
ГЕНОТИПУВАННЯ ВІРУСУ**
Методичні рекомендації

КИЇВ – 2026

Методичні рекомендації розглянуто та затверджено на засіданні Вченої ради Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол № 4 від 22 червня 2026 року).

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою при Державній службі України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № 24 від 15 липня 2026 року).

Розробники: Сушко М.І., Мандигра С.С., Романько М.Є., Музика Д.В., Алексєєва Г.Б., Піщанський О.В.

Рецензенти:

Тарасов О. А. – кандидат ветеринарних наук, завідувач лабораторії зоонозних інфекцій та оцінки ризиків Інституту ветеринарної медицини НААН України;

Уховський В. В. – доктор ветеринарних наук, професор, заступник директора з контролю якості ветеринарних імунобіологічних засобів ДНДІЛДВСЕ;

Радзиховський М. Л. – доктор ветеринарних наук, професор, старший науковий співробітник науково-дослідного вірусологічного відділу, ДНДІЛДВСЕ.

Лабораторна діагностика африканської чуми свиней молекулярно-генетичними методами та генотипування вірусу: метод. рекомендації. (2026). М.І. Сушко, С.С. Мандигра, М.Є. Романько, Д.В. Музика, Г.Б. Алексєєва, О.В. Піщанський; К: ДНДІЛДВСЕ, 2026; 76 с.

Рекомендації призначені для спеціалістів регіональних державних лабораторій Держпродспоживслужби, слухачів факультетів післядипломного навчання, лабораторій науково-дослідних установ мікробіологічного напрямку, викладачів та студентів вищих навчальних закладів III-IV рівнів акредитації зі спеціальності Н6 – Ветеринарна медицина.

ЗМІСТ

ПОЗНАЧЕННЯ ТА СКОРОЧЕННЯ.....	4
ВСТУП.....	5
1. ВИМОГИ ДО ОРГАНІЗАЦІЇ РОБОТИ У МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ.....	7
2. ВІДБІР, ТРАНСПОРТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ ПАТОЛОГІЧНОГО/БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ.....	9
3. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА АФРИКАНСЬКОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ МЕТОДАМИ. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ.....	10
4. ПІДГОТОВЛЕННЯ ЗРАЗКІВ ПАТОЛОГІЧНОГО/БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ДО ВИДІЛЕННЯ ДНК.....	13
5. ВИДІЛЕННЯ ДНК ІЗ ПАТОЛОГІЧНОГО/БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ...	13
6. ДІАГНОСТИКА АФРИКАНСЬКОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ.....	15
7. ГЕНОТИПУВАННЯ ВІРУСУ АФРИКАНСЬКОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ.....	26
8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	71
9. КОНТАМІНАЦІЯ ДОСЛІДЖУВАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ТА РЕАКТИВІВ.....	72
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	74

ПОЗНАЧЕННЯ ТА СКОРОЧЕННЯ

АЧС – африканська чума свиней;

ВПК – внутрішній позитивний контроль;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

ддНТФ – дідезоксинуклеотидтрифосфат;

дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфат;

НК – нуклеїнова кислота;

НКА – негативний контроль ампліфікації;

НКВ – негативний контроль виділення;

ПЗ – позитивний зразок;

ПКА – позитивний контроль ампліфікації;

п.н. – пара нуклеотидів;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

ПЛР-РЧ – полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу;

ФБР – фосфатно-буферний розчин.

ВСТУП

Африканська чума свиней (АЧС) – контагіозне вірусне захворювання свійських і диких свиней, яке характеризується значними економічними збитками, високою летальністю та здатністю до швидкого транскордонного поширення. Збудником захворювання є вірус африканської чуми свиней (African swine fever virus, ASFV), що належить до роду *Asfivirus* родини *Asfarviridae* та є єдиним відомим ДНК-вмісним арбовірусом. Відсутність ефективних засобів специфічної профілактики та лікування АЧС обумовлює необхідність своєчасної діагностики та проведення ефективних протиепізоотичних заходів.

Починаючи з 2007 року, після занесення вірусу АЧС на територію Грузії, захворювання набуло значного поширення в країнах Європи та Азії. В Україні АЧС вперше зареєстровано у 2012 році, після чого захворювання набуло ензоотичного характеру та продовжує становити одну з найбільш актуальних загроз для галузі свинарства. Циркуляція вірусу АЧС серед популяцій диких свиней, ризики транскордонного занесення інфекції, а також можливість тривалого збереження вірусу у навколишньому середовищі та продуктах тваринного походження суттєво ускладнюють систему контролю захворювання.

На сучасному етапі молекулярно-генетичні методи є основою лабораторної діагностики АЧС. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), зокрема ПЛР у режимі реального часу (ПЛР-РЧ), характеризується високою чутливістю, специфічністю, швидкістю виконання та можливістю виявлення вірусної ДНК на ранніх стадіях інфекційного процесу. Використання молекулярно-генетичних методів дозволяє проводити дослідження широкого спектра патологічного та біологічного матеріалу, включаючи кров, тканини внутрішніх органів.

Водночас стрімкий розвиток молекулярної епізоотології вірусу АЧС, накопичення геномних даних та поява нових варіантів вірусу, зокрема рекомбінантних штамів, обумовлюють необхідність удосконалення підходів до лабораторної діагностики та генотипування вірусу АЧС. Генотипування вірусу є важливим інструментом для встановлення джерел інфекції, дослідження шляхів

поширення збудника, вивчення молекулярної еволюції вірусу та проведення епізоотологічного аналізу.

Хоча повногеномне секвенування вважається «золотим стандартом», найпоширенішим методом генотипування вірусу АЧС є цільове секвенування окремих варіабельних локусів з подальшим філогенетичним аналізом, що є швидким, економічно доступним та ефективним підходом для рутинного епізоотологічного моніторингу, відстеження спалахів та дослідження еволюції вірусу. Особливого значення набуває використання багатолокусного підходу для диференціювання ізолятів вірусів АЧС II генотипу, що циркулюють у країнах Європи та Азії.

У методичних рекомендаціях наведено вимоги до організації роботи молекулярно-генетичної лабораторії, правила відбору, транспортування та зберігання патологічного і біологічного матеріалу, методики виділення ДНК, проведення класичної ПЛР та ПЛР-РЧ, а також підходи до генотипування вірусу АЧС із використанням секвенування за методом Сенгера та секвенування нового покоління.

Окрему увагу приділено питанням контролю якості лабораторних досліджень, попередженню контамінації зразків і реагентів, інтерпретації результатів досліджень та забезпеченню достовірності отриманих результатів.

Запропоновані методичні підходи можуть бути використані фахівцями державних та приватних лабораторій ветеринарної медицини, науково-дослідних установ, навчальних закладів, а також спеціалістами, залученими до проведення епізоотологічного моніторингу та молекулярно-генетичних досліджень вірусу АЧС.

1. ВИМОГИ ДО ОРГАНІЗАЦІЇ РОБОТИ У МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Принципи організації лабораторії та етапи проведення молекулярно-генетичних досліджень, а також робота персоналу лабораторії, де проводяться дослідження молекулярно-генетичними методами регламентовано Державними санітарними нормами і правилами 9.9.5-153-2008 «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I–IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» та ДСТУ 6051:2008 «Ветеринарна медицина. ПЛР-лабораторія для молекулярної діагностики. Загальні вимоги».

Відповідно до вищезазначених нормативних документів ПЛР-лабораторія залежно від способу детекції результатів реакції повинна включати наступний набір окремо розташованих робочих зон, або окремо виділених робочих зон у складі інших функціональних приміщень:

- Робоча зона 1 – прийому, реєстрації і первинної обробки матеріалу.
- Робоча зона 2 – виділення нуклеїнових кислот (НК).
- Робоча зона 3 – приготування реакційних сумішей.
- Робоча зона 4 – проведення ампліфікації НК.
- Робоча зона 5 – детекції продуктів ампліфікації (при застосуванні методів електрофорезу) – форезна, а також секвенування – секвенаторна.

Зональність ПЛР-лабораторії має забезпечувати односпрямований рух досліджуваного матеріалу, зразків НК, продуктів ампліфікації. При цьому передачу досліджуваного матеріалу до Робочої зони 1 та зразків, при суміжному розташуванні приміщень Робочих зон 1, 2, 3, 4 бажано здійснювати через шлюзові передавальні вікна.

Кожна робоча зона ПЛР-лабораторії повинна мати свій промаркований набір обладнання, автоматичних піпеток, наконечників, пластикового та скляного посуду, захисного одягу, гумових рукавичок, інвентарю для прибирання тощо, які використовують тільки в даному приміщенні.

Мінімальний перелік основного обладнання ПЛР-лабораторії:

Робоча зона 1: шафа біологічної безпеки II або III класу, гомогенізатор для патологічного матеріалу, високошвидкісна центрифуга (13 тис об/хв або більше) з охолодженням для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл, мініцентрифуга-струшувач для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл, набір одноканальних дозаторів зі змінними об'ємами (0,5-10 мкл; 2-20 мкл, 10-100 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл), холодильник з морозильною камерою (мінус 20°C) для короткострокового зберігання патологічного матеріалу, морозильна камера (мінус 80°C) для довгострокового зберігання патологічного матеріалу;

Робоча зона 2: шафа біологічної безпеки II або III класу, термострушувач (зі змінною температурою та частотою струшування) для пробірок об'ємом 1,5-2 мл, високошвидкісна центрифуга (13 тис. об/хв або більше) з охолодженням для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл, мініцентрифуга-струшувач для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл, набір одноканальних дозаторів зі змінними об'ємами (0,5-10,0 мкл; 2-20 мкл, 10-100 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл), холодильник з морозильною камерою (мінус 20°C) для зберігання компонентів діагностичних наборів, лабораторний відсмоктувач;

Робоча зона 3: два ПЛР-бокси (один для приготування мастерміксу, другий для внесення дослідних зразків НК в реакційну суміш), мініцентрифуга-струшувач для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл, мініцентрифуга-струшувач для стріпованих (у кількості 8 шт.) пробірок об'ємом 0,1-0,2 мл, набір одноканальних дозаторів зі змінними об'ємами (0,5-10,0 мкл; 2-20 мкл, 10-100 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл), холодильник з морозильною камерою (мінус 20°C) для короткострокового зберігання зразків виділених нуклеїнових кислот, морозильна камера (мінус 20°C) для зберігання діагностичних наборів.

Робоча зона 4: ампліфікатори для проведення класичної ПЛР та ПЛР у режимі реального часу;

Робоча зона 5: ПЛР-бокс, ампліфікатор для проведення класичної ПЛР, обладнання для проведення електрофорезу з системою документації, спектрофотометр, центрифуга, струшувач, секвенатор, мікрохвильова піч, холодильник з морозильною камерою.

Увага! Для роботи з НК використовують тільки одноразові стерильні пластикові матеріали, що мають спеціальне маркування «RNase-free» та «DNase-free». Працюють тільки в одноразових рукавичках. Всі маніпуляції, пов'язані з підготовкою зразків, проводяться дозаторами змінних об'ємів із використанням одноразових поліпропіленових пробірок та наконечників з аерозольним бар'єром. Одноразові пластикові витратні матеріали (пробірки, наконечники) повинні поміщатися у спеціальний контейнер з дезінфікуючим розчином.

Після 3-годинної дезінфекції розчин виливають у каналізацію, а відпрацьований пластик автоклавують при 1 Атм, протягом 30 хв та відправляють на перероблення у спеціалізовані підприємства.

Після проведення досліджень дозатори, лабораторне обладнання та робочі поверхні рекомендовано обробляти розчинами для руйнування ДНК/РНК.

Рекомендується опромінювати приміщення ультрафіолетом протягом 1 год до початку та 1 год після закінчення робіт.

2. ВІДБІР, ТРАНСПОРТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ ПАТОЛОГІЧНОГО/БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Відбір зразків. При підозрі на АЧС для молекулярно-генетичних досліджень в лабораторію надсилають наступні зразки:

- від загиблих свиней: шматочки селезінки, печінки, мигдалеподібної залози, серця, легень, нирок, лімфатичні вузли. Зразки слід відбирати від трупів свиней, які щойно загинули, або ті, що були важко хворими або агонізували і були гуманно вбиті. Відібрані зразки можна поміщати в одну ємкість для збору зразків.

- від трупів свиней в стані глибокого аутолізу – трубчасту кістку.

- від живих свиней: стабілізовану кров або сироватку крові. В якості стабілізатора необхідно використовувати етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТК) або цитрат натрію. Рекомендовано використовувати комерційні пробірки із даними стабілізаторами. Використання гепарину в якості стабілізатора заборонено.

Відбір зразків необхідно проводити належно обробленими інструментами.

Обробка інструментів повинна передбачати методи або засоби, які руйнують ДНК. Спиртові дезінфектанти ДНК не руйнують.

Відбір матеріалу проводять з дотриманням правил біобезпеки, не допускають потрапляння будь-якої кількості інфікованого матеріалу в зовнішнє середовище.

Транспортування. Перед транспортуванням патологічний/біологічний матеріал слід упакувати дотримуючись правил потрійної системи пакування:

1. Герметичний, пластиковий контейнер, який містить патологічний/біологічний матеріал (контейнер № 1) обгорнути абсорбуючим, змоченим дезінфектантом матеріалом і помістити в інший герметичний, пластиковий контейнер більшого розміру (контейнер № 2).

2. Контейнер № 2 помістити, обклавши його з усіх боків охолоджуючим елементом, в термоконтейнер або термосумку (спеціально призначених для транспортування інфекційного матеріалу).

Зразки направляють до лабораторії впродовж 24 год.

Зберігання зразків. Зразки рекомендовано зберігати 48-96 годин при температурі 4 °С; 1 тиждень – 1 місяць при температурі мінус 20 °С; довготривале зберігання при мінус 70 °С або нижче.

3. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА АЧС МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ МЕТОДАМИ. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Для дослідження на АЧС методом ПЛР можуть використовуватися комерційні діагностичні тест-системи та реагенти згідно стандартних операційних процедур (СОП) розроблених референтними лабораторіями.

У цих методичних рекомендаціях наводяться протоколи досліджень по виявленню ДНК вірусу АЧС та генотипуванню вірусу, які розроблені на основі СОПів референс лабораторії Європейського Союзу (ЄС) по АЧС.

Зазначення конкретних назв реактивів та їх виробників не є рекламуванням чи пропагуванням використання реактивів певних виробників, це лише вибір

розробників протоколів дослідження, які на основі їх досліджень було визначено як найбільш придатні для даного використання. Кінцевий користувач може використовувати аналогічні реактиви інших виробників, перед їх використанням необхідно провести валідацію протоколу досліджень.

При замовленні праймерів та зондів у синтезуючої компанії необхідно вказувати шкалу синтезу та метод очищення. Праймери для проведення ПЛР можна щоб були очищені методом знесолення, але краще щоб методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) або методом поліакриламідного гель-електрофорезу (PAGE), флуоресцентні зонди – обов'язкове очищення методом HPLC, праймери для секвенування – методом HPLC, за можливості, додатково методом PAGE.

Праймери та зонди поставляються в ліофілізованому вигляді. Перед першим використанням ліофілізовані праймери та зонди необхідно відновити до концентрації 100 мкМоль (100 пікоМоль/мкл) (матрична концентрація) шляхом додавання ТЕ буфера в об'ємі, що вказаний в паспорті до праймерів/ зондів. З матричної концентрації готують робочу концентрацію праймерів (наприклад концентрація ліофільновисушеного праймера (згідно паспорту/сертифікату) становить 39,7 наноМоль, для приготування 100 пікоМоль/мкл матричного розчину необхідно в пробірку з праймером додати 379 мкл ТЕ буфера; для приготування робочого розчину праймера з концентрацією 20 пікоМоль/мкл, необхідно до 20 мкл матричного розчину праймера додати 80 мкл ТЕ буфера), згідно протоколу дослідження. Матричну та робочу концентрацію праймерів та зондів зберігають за температури не вище мінус 16°C. Оскільки праймери та зонди не рекомендовано заморожувати-розморожувати більше 5-ти разів, праймери та зонди в матричній та робочій концентраціях слід розділити на аліквоти. При зміні партії праймерів/зондів або не рідше одного разу на рік проводити перевірку їх придатності шляхом дослідження референтних матеріалів.

При дослідженні зразків на АЧС методом ПЛР можуть використовуватися наступні контролю:

- Негативний контроль виділення (НКВ) – зразок, виділення ДНК з якого проводиться як із дослідних зразків, однак замість дослідного зразка додається деіонізована вода вільна від нуклеаз. Використовується для виявлення контамінації досліджуваних зразків між собою.

- Внутрішній позитивний контроль (ВПК) – ДНК, послідовність нуклеотидів якої відрізняється від послідовності нуклеотидів ДНК вірусу АЧС і яка обов'язково має бути присутньою в дослідному зразку. ВПК використовується з метою контролю правильності виділення НК та контролю інгібування ПЛР. Розрізняють екзогенний та ендогенний ВПК. В якості екзогенного ВПК використовується ДНК, яка за нормальних умов не може бути присутньою в дослідному зразку, наприклад, штучно синтезована ДНК, або ДНК вірусів рослин (у разі дослідження зразків від тварин). Ендогенний ВПК – ДНК, яка вже присутня в дослідному зразку, наприклад гени, які постійно експресуються в різних тканинах, є важливими для забезпечення життєдіяльності клітини і є консервативними у різних видів тварин (наприклад, ген β -актину). Ендогенний ВПК також дає можливість визначати придатність дослідних зразків до дослідження та правильність відбору зразків. Особливо важливе його використання при дослідженні зразків, які піддалися глибокому аутолізу.

- Позитивний контроль ампліфікації (ПКА) – зразок, який містить порогову концентрацію цільової ДНК і при цьому стабільно виявляється. ПКА дає змогу контролювати правильність приготування реакційної суміші та якість реактивів.

- Негативний контроль ампліфікації (НКА) – зразок, який не містить ДНК. НКА дає змогу виявити контамінацію реактивів ДНК.

- Позитивний зразок (ПЗ) – зразок, який завідомо містить цільову послідовність ДНК, використовується для контролю всіх етапів ПЛР.

- Негативний зразок (НЗ) – зразок, який не містить цільової послідовності ДНК, але містить саму ДНК.

НКВ, ПКА, НКА, ВПК або ПЗ є обов'язковими та повинні використовуватися при кожній постановці ПЛР.

У випадку, якщо протоколом дослідження не передбачено використання ВПК, то необхідно використовувати ПЗ.

Графіки накопичення інтенсивності флуоресценції повинні мати правильну сигмоїдну або логарифмічну форму. У випадку, коли графік має іншу форму необхідно повторно провести дослідження зразка.

4. ПІДГОТОВЛЕННЯ ЗРАЗКІВ ПАТОЛОГІЧНОГО/БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ДО ВИДІЛЕННЯ ДНК

Підготовка матеріалу для дослідження проводиться в Робочій зоні 1 – прийому, реєстрації і первинної обробки матеріалу.

Внутрішні органи тварин і секційний матеріал нарізають на маленькі шматки використовуючи стерильні ножиці та пінцет і переносять приблизно 150-200 мг матеріалу в стерильну пробірку, яка містить кульку із нержавіючої сталі, додають 450-600 мкл стерильного фізіологічного розчину (рН $7,2 \pm 0,2$) або фосфатно-буферного розчину (ФБР) і гомогенізують при 30 Гц протягом 4 хв. У разі відсутності гомогенізатора можна використовувати стерильну фарфорову ступку з товкачиком. Пробірку з гомогенізатом центрифугують протягом 10 хв при $1100 \times g$ (3000 об/хв). Супернатант використовують для екстракції ДНК.

Стабілізовану кров та сироватку використовують без попередньої підготовки.

5. ВИДІЛЕННЯ ДНК ІЗ ПАТОЛОГІЧНОГО/БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Виділення ДНК із досліджуваного матеріалу проводиться в Робочій зоні 2 – виділення НК.

Метою даного етапу є виділення ДНК з клітин та очищенні її від білків, жирів, вуглеводів та дезактивації клітинних ферментів. Процес виділення ДНК складається з наступних етапів:

- лізування (під час даного етапу відбувається руйнування мембран клітин і ядер, вихід ДНК в розчин, звільнення її від білків та дезактивація клітинних

ферментів);

- адсорбція ДНК (зв'язування ДНК з адсорбуючою речовиною, яка може знаходитися у вигляді суспензії, мембрани фільтрувальних колонок чи на поверхні магнітних частинок в залежності від набору, який використовується для виділення ДНК);

- відмивання (ДНК від білків, жирів, вуглеводів і залишків клітинних мембран);

- елюція (відокремлення ДНК від адсорбуючої речовини і перехід ДНК в розчин).

Екстракція ДНК з досліджуваного матеріалу проводиться разом з ВПК, що дозволяє контролювати процедуру екстракції ДНК.

Виділену ДНК зберігають при температурі від 2 до 8 °С від кількох днів до 1–2 тижнів, при температурі не вище мінус 20 °С від кількох місяців до 1 року, і більш тривало при температурі не вище мінус 80 °С, слід мінімізувати кількість циклів замороження-розмороження.

Хімічний склад розчину, в якому знаходиться ДНК, має вирішальне значення для її стабільності. ТЕ-буфер (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5–8.0) – найкращий вибір. Tris-HCl підтримує оптимальний слабо лужний pH. У кислому середовищі (pH < 7,0) значно прискорюється процес депуринізації ДНК. ЕДТК зв'язує (хелатує) іони двовалентних металів (Mg^{2+} , Mn^{2+}), які є обов'язковими кофакторами для роботи клітинних нуклеаз (ДНКаз). Без них випадкові контамінантні нуклеази не можуть деградувати ДНК.

Примітка для NGS/ПЛР: Якщо ДНК планується використовувати для високочутливих реакцій, де ЕДТК може інгібувати полімеразу, використовують ТЕ-буфер зі зниженим вмістом ЕДТК (0,1 mM) або низькосольовий Tris-HCl.

Деіонізована/ультрачиста вода (без нуклеаз) – тільки для швидкого використання. Зберігання у воді допускається, лише якщо зразок буде повністю використаний найближчим часом. Вода не має буферної ємності, її pH може легко зміщуватися в кислий бік (наприклад, через розчинення CO_2 з повітря), що призводить до деградації ДНК.

Для екстракції ДНК із дослідних зразків використовують комерційні набори для виділення ДНК або ДНК/РНК.

6. ДІАГНОСТИКА АЧС МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

6.1 Виявлення ДНК вірусу АЧС методом класичної ПЛР

Цей протокол дослідження описує виявлення ДНК вірусу АЧС за допомогою класичної ПЛР. Для виявлення ДНК вірусу АЧС використовується набір праймерів, які розроблені для ампліфікації висококонсервативної ділянки гена, що кодує білок VP72, забезпечує виявлення широкого спектра ізолятів вірусу АЧС, які належать до всіх 24 відомих генотипів вірусу. Цей набір праймерів ампліфікує фрагмент ДНК довжиною 257 пар нуклеотидів (п.н.) від 88363 до 88619 позиції нуклеотидів референтного штаму BA71V (GenBank ASU18466).

Даним протоколом не передбачено використання ВПК, тому потрібно використовувати ПЗ.

Реагенти

- Набір реагентів для ампліфікації ДНК: Platinum™ SuperFi II Green PCR Master Mix, Invitrogen;
- Праймери в концентрації 20 мкМ

Таблиця 1

Послідовність нуклеотидів праймерів

№ п/п	Назва праймера	Послідовність нуклеотидів в праймері (5'→3')
1	PPA-1	AGTTATGGGAAACCCGACCC
2	PPA-2	CCCTGAATCGGAGCATCCT

- Агароза: UltraPure™ Agarose, Invitrogen або аналог;
- Бромід етидію: Ethidium Bromide Solution, Invitrogen або аналог;
- Маркер молекулярної ваги: CSL-MDNA-100BPH, Cleaver Scientific Ltd або аналог;
- Буфер для проведення електрофорезу: 10× TAE Buffer, Invitrogen, або аналог.

Протокол дослідження

1. Підрахуйте необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготуйте відповідну кількість пробірок / лунок плашки.

2. Розморозьте необхідні реагенти, змішайте шляхом вортексування і осадіть краплі реактивів з кришок пробірок шляхом короткочасного центрифугування.

3. Приготуйте реакційну суміш згідно з таблицею 2

Таблиця 2

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	2X Platinum™ SuperFi™ II Green PCR Master Mix	2X	1X	12,5
2	Прямий праймер PPA-1	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
3	Зворотний праймер PPA-2	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
4	Water, nuclease-free	-	-	10
Загальний об'єм суміші				23,0

4. Додайте реакційну суміш в пробірки/лунки плашки по 23 мкл.

5. До 23,0 мкл реакційної суміші додайте 2 мкл досліджуваного зразка/контролю.

6. Центрифугуйте пробірки/плашку при низькій швидкості (для осадження внесених зразків на дно пробірок/лунок плашки і змішування їх з реакційною сумішшю).

7. Помістіть пробірки/плашку із зразками в ампліфікатор.

8. Запустіть програмне забезпечення ампліфікатора і встановіть наступні параметри ампліфікації згідно з таблицею 3.

Таблиця 3

Параметри ампліфікації

Етап		Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Ініціалізація	98 °C -30 с	1
2. Циклювання	Денатурація	98 °C-10 с	40
	Відпал	62 °C-30 с	
	Елонгація	72 °C-30с	
3. Утримування	Додаткова елонгація	72 °C-7 хв.	1
4. Утримування		4 °C ∞	1

Продукти ампліфікації для проведення електрофорезу можна зберігати при температурі 4 ± 3 °C до не більше 18 годин.

Електрофорез в агарозному гелі

1. Приготуйте 2 % розчин агарози, кількість агарози залежить від величини камери для проведення електрофорезу. Для цього, на кожні 100 мл розчину агарози, до 2 гр. агарози додайте 100 мл 1x TAE буферу, нагрійте розчин у мікрохвильовій печі, доки агароза повністю не розплавиться, додайте 10 мкл етидію броміду, обережно струсіть для гомогенізації розчину.

2. Приготуйте лоток для гелю, закривши кінці гумовими ущільнювачами та розмістивши відповідну кількість гребінок. Вилийте розплавлену агарозу в лоток для гелю. Очікуйте, доки гель не затвердіє (приблизно 20 хвилин).

3. Обережно зніміть ущільнення з лотка та помістіть його в камеру для проведення електрофорезу. Додайте буфер для електрофорезу, доки він повністю не покриє гель. Обережно витягують гребінці.

5. Додайте по 10 мкл зразка у відповідні лунки гелю.

6. Додайте 5 мкл ДНК-маркера молекулярної маси в одну лунку кожного ряду гелю.

7. Підключіть джерело живлення (зразки ДНК будуть рухатися в бік позитивного електрода). Електрофорез проводять при постійній напрузі 150–200 В протягом приблизно 30–40 хвилин.

8. Після проведення електрофорезу, для аналізу результатів дослідження пластинку гелю поміщають на ультрафіолетовий транслюмінатор або в систему для гелю документації.

Аналіз та інтерпретація результатів

Інтерпретацію результатів ампліфікації досліджуваних зразків проводять після отримання коректних результатів контролів (позитивний контроль повинен бути позитивним (у гелі повинна чітко візуалізуватися смуга строго визначеного розміру (відповідно до довжини амплікону), негативний контроль та негативний контроль виділення – негативними (не повинно спостерігатися смуг).

У позитивному зразку на доріжці зразка повинна бути наявна чітка, виражена смуга, яка знаходиться на одному рівні зі смугою позитивного контролю та відповідає очікуваному розміру (257 п.н.). У негативному зразку на доріжці зразка не повинна спостерігатися виражена смуга.

6.2 Виявлення ДНК вірусу АЧС методом ПЛР-РЧ (King et. al)

Цей протокол дослідження описує виявлення ДНК вірусу АЧС за допомогою ПЛР-РЧ. Для виявлення ДНК використовується набір праймерів та специфічний зонд TaqMan, спрямований на висококонсервативну ділянку вірусного гену, що кодує білок VP72, забезпечує виявлення широкого спектру ізолятів вірусу АЧС, які належать до всіх 24 відомих генотипів вірусу. Праймери ампліфікують фрагмент ДНК довжиною 250 п.н., від позиції нуклеотидів 2041 до 2290 гена що кодує білок VP72 еталонного штаму BA71V (GenBank ASU18466). Зонд TaqMan, що використовується для виявлення ампліфікованого продукту, мічений барвником FAM.

Наразі ця методика включена як рекомендований ВООЗТ метод ПЛР у реальному часі згідно розділу 3.9.1 «Посібника з діагностичних тестів та вакцин для наземних тварин» (видання 2025 року).

Даним протоколом не передбачено використання ВПК, тому потрібно використовувати ПЗ.

Реагенти

- Набір реагентів для ампліфікації ДНК: QuantiFast Probe PCR, Qiagen;
- Праймери (в концентрації 20 мкМ) та зонд (в концентрації 10 мкМ)

Таблиця 4

Послідовність нуклеотидів праймерів та зондів

№ п/п	Назва праймера/ зонда	Послідовність нуклеотидів в праймері / зонді (5'→3')
1	King-s	CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA
2	King-a	GATACCACAAGATCRGCCGT
3	TaqMan probe	FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-TAMRA

Протокол дослідження

1. Підрахуйте необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготуйте для них пробірки/лунки плашки.
2. Розморозьте всі компоненти набору, змішайте шляхом вортексування і осадіть краплі реактивів з кришок пробірок шляхом короткочасного центрифугування.
3. Приготуйте реакційну суміш згідно з таблицею 5

Таблиця 5

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	Вода вільна від нуклеаз	-	-	6,7
2	2x QuantiFast Probe PCR Master Mix	2X	1X	10,0
3	Прямий праймер King-s	20 мкМ	0,4 мкМ	0,4
4	Зворотний праймер King-a	20 мкМ	0,4 мкМ	0,4
5	Зонд TaqMan probe	10 мкМ	0,25 мкМ	0,5
Загальний об'єм суміші				18,0

4. Додайте реакційну суміш в пробірки/лунки плашки по 18 мкл.
5. До 18,0 мкл реакційної суміші додають 2 мкл досліджуваного зразку/контролю.
6. Центрифугуйте пробірки/плашку при низькій швидкості (для осадження внесених зразків на дно пробірок/лунок плашки і змішування їх з реакційною сумішшю).
7. Помістіть пробірки/плашку із зразками в ампліфікатор.
8. Запустіть програмне забезпечення ампліфікатора і встановіть наступні параметри ампліфікації згідно з таблицею 6.

Таблиця 6

Параметри ампліфікації

Етап		Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Ініціалізація	95 °C - 3 хв	1
2. Циклювання	Денатурація	95 °C-10 с	45
	Відпал	58 °C-30 с - детекція (FAM)	

Таблиця 7

Облік та інтерпретація результатів дослідження контролів

Контроль	Очікувані результати	Дії у випадку некоректних результатів
ПКА	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct 32 ± 4	Перевірити термін придатності, умови зберігання реактивів та правильність приготування реакційної суміші. Повторити дослідження починаючи з ПЛР-РЧ, за можливості використати нові реагенти
НКА	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з етапу постановки ПЛР-РЧ використовуючи нові реагенти
НКВ	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з виділення ДНК
ПЗ	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності та правильність розведення буферів набору для виділення ДНК. Повторити дослідження починаючи з етапу виділення ДНК

Таблиця 8

Облік та інтерпретація результатів дослідження зразків

Результат	Інтерпретація та дії
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct < 40	Зразок позитивний (виявлено ДНК вірусу АЧС)
Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, значення Ct ≥ 40	Зразок негативний (ДНК вірусу АЧС не виявлено)

6.3 Виявлення ДНК вірусу АЧС методом ПЛР-РЧ (UPL протокол)

Цей протокол дослідження описує виявлення ДНК вірусу АЧС за допомогою ПЛР-РЧ. Для виявлення ДНК використовує набір праймерів, специфічних до вірусу АЧС, у поєднанні з відповідними зондами [зонд UPL (UPL#162, Roche Applied Science) або зонд TaqMan (VP72P1)], спрямованими на висококонсервативну ділянку вірусного гену, що кодує білок VP72, забезпечує виявлення широкого спектру ізолятів вірусу АЧС, які належать до різних вірусних генотипів вірусу АЧС. Праймери ампліфікують фрагмент ДНК

довжиною 68 п.н., від позиції нуклеотидів 893 до 960 повної послідовності гена, що кодує VP72 еталонного штаму ASFV Spain70 (GenBank S89966). Зондами, що використовуються в цій процедурі, є зонд UPL під назвою UPL#162, який можна придбати у компанії Roche Applied Science, та стандартний зонд TaqMan. Зонди мічені флуоресцентним барвником FAM.

Реагенти

- Набір реагентів для ампліфікації ДНК: LightCycler 480 Probes Master kit, Roche Applied Science;
- Праймери (20 мкМ) та зонди (10 мкМ)

Таблиця 9

Послідовність нуклеотидів праймерів та зондів

№ п/п	Назва праймера/ зонда	Послідовність нуклеотидів в праймері / зонді (5'→3')
1	ASF-162/I2	CCCAGGARGATAAAAATGACTG
2	ASF-162/V2	CACTRGTTCCCTCCACCGATA
3	ASF-VP72P1	FAM-TCCTGGCCRACCAAGTGCTT-BHQ3
4	UPL-162 probe	FAM-GGCCAGGA- BHQ3

Протокол дослідження

1. Підрахуйте необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготуйте для них пробірки/лунки плашки.
2. Розморозьте необхідні реактиви, змішайте вортексуванням і осадіть краплі реактивів з кришок пробірок шляхом короткочасного центрифугування.
3. Приготуйте реакційну суміш згідно з таблицею 10.

Таблиця 10

Приготування реакційної суміші

Реакційна суміш із використанням TaqMan зонду ASF-VP72P1				
№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	Вода вільна від нуклеаз	-	-	6,8
2	Master Mix	2X	1X	10,0
3	Прямий праймер ASF-162/I2	20 мкМ	0,4 мкМ	0,4
4	Зворотний праймер ASF-162/V2	20 мкМ	0,4 мкМ	0,4
5	ASF-VP72P1	10 мкМ	0,2 мкМ	0,4
Загальний об'єм суміші				18,0

4. Додайте реакційну суміш в пробірки/лунки плашки по 18 мкл.

5. До 18,0 мкл реакційної суміші додають 2 мкл досліджуваного зразка/контролю.

6. Центрифугуйте пробірки/плашку при низькій швидкості (для осадження внесених зразків на дно пробірок/лунок плашки і змішування їх з реакційною сумішшю).

7. Приготуйте реакційну суміш згідно з таблицею 11.

Таблиця 11

Приготування реакційної суміші

Реакційна суміш із використанням зонду UPL-162				
№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	Вода вільна від нуклеаз	-	-	6,8
2	Master Mix	2X	1X	10,0
3	Прямий праймер ASF-162/I2	20 мкМ	0,4 мкМ	0,4
4	Зворотний праймер ASF-162/V2	20 мкМ	0,4 мкМ	0,4
5	UPL-162	10 мкМ	0,1 мкМ	0,2
Загальний об'єм суміші				18,0

8. Додайте реакційну суміш в пробірки/лунки плашки по 18 мкл.

9. До 18,0 мкл реакційної суміші додають 2 мкл досліджуваного зразка/контролю.

10. Помістіть пробірки/плашку із зразками в ампліфікатор.

11. Запустіть програмне забезпечення ампліфікатора і встановіть наступні параметри ампліфікації згідно з таблицею 12.

Таблиця 12

Параметри ампліфікації

Етап		Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Ініціалізація	95 °C - 5 хв	1
2. Циклювання	Денатурація	95 °C-10 с	45
	Відпал	60 °C-30 с - детекція (FAM)	

Таблиця 13

Облік та інтерпретація результатів дослідження контролів

Контроль	Очікувані результати	Дії у випадку некоректних результатів
ПКА	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми	Перевірити термін придатності, умови зберігання реактивів та правильність приготування реакційної суміші. Повторити дослідження починаючи з ПЛР-РЧ, за можливості використати нові реагенти
НКА	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з етапу постановки ПЛР-РЧ використовуючи нові реагенти
НКВ	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з виділення ДНК
ПЗ	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності та правильність розведення буферів набору для виділення ДНК. Повторити дослідження починаючи з етапу виділення ДНК

Таблиця 14

Облік та інтерпретація результатів дослідження зразків

Результат	Інтерпретація та дії
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct < 35	Зразок позитивний (виявлено ДНК вірусу АЧС)
Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, значення Ct $\geq$ 40	Зразок негативний (ДНК вірусу АЧС не виявлено)
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct між 35 та 40	Зразок сумнівний. Необхідно повторити дослідження досліджуючи зразок в дублікатах. Зразок вважають позитивним у випадку коли значення Ct принаймі в одному дублікаті < 40

6.4. Виявлення ДНК рекомбінантного штаму вірусу АЧС методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу

Цей протокол дослідження описує дуплексну ПЛР-РЧ, призначену для одночасного виявлення та диференціації штамів вірусу АЧС генотипу I,

генотипу II та рекомбінантного штаму генотипу I/II. Протокол розроблений Naoki Yoshida та ін.

Для проведення ПЛР-РЧ використовують два набори праймерів і TaqMan-зондів, специфічних до гену CP2475L вірусу АЧС, в якому відбулася рекомбінація, в результаті чого ген містить нуклеотидні послідовності характерні для вірусу АЧС I та II генотипів. Праймери CP2475L-GI-F та CP2475L-GI-R ампліфікують фрагмент гена CP2475L довжиною 199 п.н., який специфічний для вірусу АЧС I генотипу. Відповідний зонд CP2475L-GI-P мічений флуоресцентним барвником FAM.

Праймери CP2475L-GII-F та CP2475L-GII-R ампліфікують фрагмент гена CP2475L довжиною 318 п.н., який специфічний для вірусу АЧС II генотипу. Зонд CP2475L-GII-P мічений флуоресцентним барвником Cy5.

Реагенти

- Набір реагентів для ампліфікації ДНК: Path-ID™ qPCR Master Mix, Applied Biosystems;
- Праймери та зонд в концентрації 10 мкМ

Таблиця 15

Послідовність нуклеотидів праймерів та зондів

№ п/п	Назва праймера/ зонда	Послідовність нуклеотидів в праймері / зонді (5'→3')
1	CP2475L-GI-F	CTACCAAATATCTTGCGGCTAATTC
2	CP2475L-GI-R	AGAAATCCAGGATTGGTTGTAAAGG
3	CP2475L-GI-P	FAM-CCTCCACCAGCAGGAATACC
4	CP2475L-GII-F	GCGGTTAATTGTGCACCGG
5	CP2475L-GII-R	TGTGCGTACTATACGATTGGCTG
6	CP2475L-GII-P	Cy5-CCCAGTTTTGAATGGCAGCG

Протокол дослідження

1. Підрахуйте необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготуйте для них пробірки/лунки плашки.
2. Розморозьте всі компоненти набору, змішайте шляхом вортексування і осадіть краплі реактивів з кришок пробірок шляхом короткочасного центрифугування.

3. Приготуйте реакційну суміш згідно з таблицею 16.

Таблиця 16

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	мкл на реакцію
1	2X qPCR Master Mix	2X	12,5
2	CP2475L-GI-F	10 мкМ	0,5
3	CP2475L-GI-R	10 мкМ	0,5
4	CP2475L-GI-P	10 мкМ	0,2
5	CP2475L-GII-F	10 мкМ	0,5
6	CP2475L-GII-R	10 мкМ	0,5
7	CP2475L-GII-P	10 мкМ	0,2
8	Вода вільна від нуклеаз	-	8,1
Загальний об'єм суміші			23,0

4. Додайте реакційну суміш в пробірки/лунки плашки по 23 мкл.

5. До 23,0 мкл реакційної суміші додати 2 мкл досліджуваного зразка/контролю.

6. Центрифугуйте пробірки/плашку при низькій швидкості (для осадження внесених зразків на дно пробірок/лунок плашки і змішування їх з реакційною сумішшю).

7. Помістіть пробірки/плашку із зразками в ампліфікатор.

8 Запустіть програмне забезпечення ампліфікатора і встановіть наступні параметри ампліфікації згідно з таблицею 17.

Таблиця 17

Параметри циклювання

Етап		Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Ініціалізація	95 °C - 10 хв	1
2. Циклювання	Денатурація	95 °C-15 с	45
	Відпал/елонгація	60 °C-30 с - детекція (FAM, Cy5)	

Облік та інтерпретація результатів дослідження контролів

Контроль	Очікувані результати	Дії у випадку некоректних результатів
ПКА	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM та Cy5, графік правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності, умови зберігання реактивів та правильність приготування реакційної суміші. Повторити дослідження починаючи з ПЛР-РЧ, за можливості використати нові реагенти
НКА	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM та Cy5 і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з етапу постановки ПЛР-РЧ використовуючи нові реагенти
НКВ	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM та Cy5 і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з виділення ДНК
ПЗ	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM та Cy5, графіки правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності та правильність розведення буферів набору для виділення ДНК. Повторити дослідження починаючи з етапу виділення ДНК

Облік та інтерпретація результатів дослідження зразків

Результат	Інтерпретація та дії
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct < 40	Зразок позитивний (виявлено ДНК вірусу АЧС І генотипу)
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника та Cy5, графік правильної форми, значення Ct < 40	Зразок позитивний (виявлено ДНК вірусу АЧС ІІ генотипу)
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM та Cy5, графіки правильної форми, значення Ct < 40	Зразок позитивний (виявлено ДНК рекомбінантного (І та ІІ генотипу) штаму вірусу АЧС)
Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM та Cy5, значення Ct ≥ 40	Зразок негативний (ДНК вірусу АЧС не виявлено)

7. ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНОТИПУ ВІРУСУ АЧС СЕКВЕНУВАННЯМ ЗА МЕТОДОМ СЕНГЕРА

Визначення генотипу вірусу АЧС проводиться шляхом секвенування С- термінального кінця гена В646L (кодує білок р72), що дає можливість

диференціювати 24 генотипи вірусу АЧС.

В основі принципу секвенування методом Сенгера (метод термінуючих нуклеотидів) лежить принцип ферментативного синтезу комплементарного ланцюга ДНК по існуючій одноланцюговій матриці з його блокуванням в різних місцях ддНТФ. У результаті цього утворюється велика кількість фрагментів ДНК, які відрізняються між собою довжиною на 1 нуклеотид.

Процес секвенування складається з наступних етапів:

1. Виділення ДНК з досліджуваного матеріалу;
2. Накопичення фрагмента ДНК, який буде секвеновано;
3. Проведення електрофорезу;
4. Виділення ДНК з агарозного гелю або очищення ПЛР продукту;
5. Вимірювання концентрації ДНК і оцінка чистоти розчину ДНК;
6. Проведення секвенувальної ПЛР;
7. Очищення ПЛР продукту;
8. Проведення капілярного електрофорезу.

Реактиви

- Набір реагентів для ампліфікації ДНК: Platinum™ SuperFi II Green PCR Master Mix, Invitrogen;
- Праймери (20 мкМ)

Таблиця 20

Послідовність нуклеотидів праймерів

Назва праймера	Послідовність	Довжина фрагменту
p72- U	GGCACAAGTTCGGACATGT	478 п.н.
p72-D	GTA CTGT AACGCAGCACAG	

- Агароза: UltraPure™ Agarose, Invitrogen або аналог;
- Бромід етидію: Ethidium Bromide Solution, Invitrogen або аналог;
- Маркер молекулярної ваги: CSL-MDNA-100BPH, Cleaver Scientific Ltd або аналог;
- Буфер для проведення електрофорезу: 10× TAE Buffer, Invitrogen;

- Буфер для завантаження зразків в агарозний гель: 10× BlueJuice Gel Loading Buffer;
- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems;
- BigDye XTerminator™ Purification Kit, Applied Biosystems;
- POP-7™ Polymer for 3730/3730xl DNA Analyzers, Applied Biosystems;
- 3730 Running Buffer (10X), Applied Biosystems.

ЕТАП 1. Виділення ДНК з досліджуваного матеріалу проводять згідно розділу 5.

ЕТАП 2. Накопичення фрагменту ДНК, який буде секвеновано

Цей етап проводиться в ЗОНІ 3 – кімната для приготування реакційної суміші та виділення НК.

Накопичення фрагменту ДНК, який буде секвеновано, необхідно для подальшого проведення секвенувальної ПЛР, з метою отримання фрагментів ДНК, які будуть відрізнятися довжиною на 1 нуклеотид. Для цього проводять класичну ПЛР.

Протокол дослідження

1. Підрахуйте необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготуйте відповідну кількість пробірок/лунок плашки.

2. Розморозьте всі компоненти набору, змішайте шляхом вортексування і осадіть краплі реактивів з кришок пробірок шляхом короткочасного центрифугування.

3. Приготуйте реакційну суміш згідно з таблицею 21.

Таблиця 21

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	2X Platinum™ SuperFi™ II Green PCR Master Mix	2X	1X	12,5
2	Прямий праймер p72- U	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
3	Зворотний праймер p72-D	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
4	Water, nuclease-free	-	-	10
Загальний об'єм суміші				23,0

4. Додайте реакційну суміш в пробірки/лунки плашки по 23 мкл.
5. До 23,0 мкл реакційної суміші додайте 2 мкл досліджуваного зразка/контролю.
6. Центрифугуйте пробірки/плашку при низькій швидкості (для осадження внесених зразків на дно пробірок/лунок плашки і змішування їх з реакційною сумішшю).
7. Помістіть пробірки/плашку із зразками в ампліфікатор.
- 8 Запустіть програмне забезпечення ампліфікатора і встановіть наступні параметри ампліфікації згідно з таблицею 22.

Таблиця 22

Параметри ампліфікації

	Етап	Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Ініціалізація	98 °C-30 с	1
2. Циклювання	Денатурація	98 °C-10 с	40
	Відпал	62 °C-30 с	
	Елонгація	72 °C-30с	
3. Утримування	Додаткова елонгація	72 °C-7 хв.	1
4. Утримування		4 °C ∞	1

ЕТАП 3. Проведення електрофорезу

Цей етап проводиться в ЗОНІ 4 Кімната для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР.

Метою цього етапу є підтвердження того, що ПЛР пройшла належним чином і відбулося накопичення специфічного, заздалегідь відомої довжини фрагмента ДНК, а також виявлення ампліфікації неспецифічних фрагментів ДНК. Електрофорез проводять в 2% агарозному гелі з використанням відповідних ДНК маркерів, як описано в розділі 6.1.

ЕТАП 4. Виділення ДНК з агарозного гелю або очищення ПЛР продукту

Цей етап проводиться в ЗОНІ 4 – кімната для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР, проведення секвенування НК.

У випадку, коли в агарозному гелі, окрім ампліфікованих специфічних фрагментів (довжина ампліфікованих фрагментів ДНК відповідає очікуваній довжині) виявляють також ампліфікацію неспецифічних фрагментів ДНК, то з

агарозного гелю вирізають лише специфічні фрагменти ДНК і проводять їх очищення. У випадку, коли виявляють лише специфічні фрагменти кДНК, проводять очищення реакційної суміші.

Очищення фрагменту ДНК з агарозного гелю та ПЛР реакції проводять за допомогою використання комерційних наборів згідно інструкції до набору.

Метою цього етапу є очищення розчину ДНК від компонентів, які можуть негативно впливати на проведення секвенувальної ПЛР (праймерів, димерів праймерів, нуклеотидів, залишків агарози, інтеркалюючих барвників, детергентів (Твін), добавок (бетаїн)). Очищення розчину ДНК складається з наступних етапів:

- розчинення агарози;
- адсорбція ДНК (зв'язування ДНК адсорбуючою речовиною, яка може знаходитися у вигляді суспензії, мембрани фільтрувальних колонок чи на поверхні магнітних частинок залежно від набору, який використовується для очищення);
- відмивання (відмивання адсорбуючої речовини від вище перерахованих компонентів, які також можуть зв'язуватися з адсорбуючою речовиною);
- елюція (відокремлення ДНК від адсорбуючої речовини і перехід ДНК в розчин).

Виділення ДНК з агарозного гелю або очищення ПЛР продукту із використанням комерційних наборів згідно з інструкцією виробника.

ЕТАП 5. Вимірювання концентрації ДНК і оцінка чистоти розчину ДНК.

Цей етап проводиться в ЗОНІ 4 – кімната для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР, проведення секвенування НК.

Вимірюють концентрацію ДНК за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 260 нм. Вимірювання проводять згідно інструкції до приладу.

Ступінь чистоти розчину ДНК визначають за співвідношенням величини поглинання дослідним зразком за довжини хвилі 260 нм до величини поглинання дослідним зразком за довжини хвилі 280 нм. Величина даного співвідношення

повинна бути в межах від 1,8 до 2,0. Нижче значення цього співвідношення вказує на забруднення дослідного зразку білками або іншими органічними речовинами.

ЕТАП 6. Проведення секвенувальної ПЛР

Цей етап проводиться в ЗОНІ 4 – кімната для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР, проведення секвенування НК.

Метою етапу є генерація пулу флуоресцентно маркованих фрагментів ДНК, довжина яких відрізняється на один нуклеотид. Цей ефект досягається завдяки використанню оптимізованої суміші дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ) та дидезоксинуклеотидтрифосфатів (ддНТФ). Оскільки молекули ддНТФ позбавлені гідроксильної групи в 3'-положенні пентозного кільця, їх приєднання ДНК-полімеразою унеможливорює утворення наступного фосфодієфірного зв'язку, що призводить до термінації синтезу комплементарного ланцюга. Вбудовування ддНТФ відбувається стохастично (випадковим чином), що забезпечує утворення набору фрагментів ДНК різної довжини.

Для детекції ампліконів та ідентифікації термінуючого нуклеотиду застосовують маркування ддНТФ флуоресцентними барвниками. Кожен із чотирьох типів ддНТФ кон'югований зі специфічним флуорофором, спектри емісії яких максимально розмежовані, що мінімізує перекривання флуоресцентних сигналів.

Секвенування кожного дослідного зразка виконують в обох напрямках. Це дозволяє отримати набір фрагментів ДНК, де кожен термінальний ддНТФ несе унікальну флуоресцентну мітку.

Підготовку реакційної суміші для секвенувальної ПЛР здійснюють відповідно до протоколу виробника набору BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems.

На кожний зразок готують і маркують 2 пробірки об'ємом 0,2 мл: перша призначена для реакції з прямим (forward) праймером, друга — зі зворотним (reverse). З метою забезпечення оптимального виходу мічених ампліконів,

достатньої інтенсивності флуоресцентного сигналу під час капілярного електрофорезу та високої достовірності зчитування нуклеотидної послідовності, концентрацію матричної ДНК у дослідному зразку попередньо стандартизують у межах 3–10 нг/мкл.

Протокол дослідження

1. Підрахуйте необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготуйте відповідну кількість пробірок/лунок плашки.

2. Розморозьте всі компоненти набору, змішайте шляхом вортексування і осадіть краплі реактивів з кришок пробірок шляхом короткочасного центрифугування.

3. Приготуйте реакційну суміш згідно з таблицею 23.

Таблиця 23

Реакційна суміш для проведення секвенувальної ПЛР

p72U		p72D	
Праймер p72U (3,2pmol)	1 мкл	Праймер p72D (3,2pmol)	1 мкл
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл	BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл
Вода вільна від нуклеаз	10 мкл	Вода вільна від нуклеаз	10 мкл
Загальний об'єм	19 мкл	Загальний об'єм	19 мкл

4. Додайте реакційну суміш в пробірки/лунки плашки по 19 мкл.

5. До 19,0 мкл реакційної суміші додайте 1 мкл досліджуваного зразка/контролю.

6. Центрифугуйте пробірки/плашку при низькій швидкості (для осадження внесених зразків на дно пробірок/лунок плашки і змішування їх з реакційною сумішшю).

7. Помістіть пробірки/плашку із зразками в ампліфікатор.

8. Запустіть програмне забезпечення ампліфікатора і встановіть наступні параметри ампліфікації згідно з таблицею 24.

Параметри ампліфікації

	Етап	Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Ініціалізація	95 °C -1 хв	1
2. Циклювання	Денатурація	95 °C-10 с	40
	Відпал	50 °C-5 с	
	Елонгація	60 °C-4 хв.	
4. Утримування		4 °C ∞	1

ЕТАП 7. Очищення ПЛР продукту після секвенувальної ПЛР

Цей етап проводиться в ЗОНІ 4 – кімната для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР, проведення секвенування НК.

Метою цього етапу є очищення розчину ДНК від компонентів, які можуть негативно впливати на якість проведення капілярного електрофорезу (мічених нуклеотидів, солей).

Проводити очищення продукту секвенувальної ПЛР від невикористаних дНТФ, мічених ддНТФ та іонів солей можна за допомогою використання комерційних наборів, зокрема набору BigDye XTerminator purification kit, Applied Biosystems.

Очищення розчину кДНК складається з наступних етапів:

- адсорбція кДНК (зв'язування кДНК адсорбуючою речовиною, яка може знаходитися у вигляді суспензії, мембрани фільтрувальних колонок чи на поверхні магнітних частинок в залежності від набору, який використовується для очищення);
- відмивання (відмивання адсорбуючої речовини від вище перерахованих речовин, які також можуть зв'язуватися з адсорбуючою речовиною);
- елюція (відокремлення ДНК від адсорбуючої речовини і перехід ДНК в розчин).

ЕТАП 8. Проведення капілярного електрофорезу і визначення нуклеотидної послідовності ДНК

Цей етап проводиться в ЗОНІ 4 – кімната для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР, проведення секвенування НК.

Для встановлення послідовності нуклеотидів ДНК проводять капілярний

електрофорез за допомогою генетичного аналізатора, який дає можливість розділити фрагменти ДНК, які відрізняються між собою довжиною на один нуклеотид. Принцип процесу ґрунтується на електрокінетичному розділенні: під дією постійного електричного поля негативно заряджені фрагменти ДНК мігрують через капіляр, заповнений рідким полімером. Швидкість міграції обернено пропорційна молекулярній масі (довжині) фрагментів, завдяки чому коротші ланцюги ДНК рухаються швидше та проходять через капіляр першими.

Під час проходження фрагментів через оптичне вікно (зону детекції) приладу лазерне випромінювання збуджує флуорофори, якими марковані термінальні нуклеотиди. Оптична система фіксує спектри емісії, після чого спеціалізоване програмне забезпечення генетичного аналізатора інтерпретує отримані оптичні сигнали, автоматично конвертуючи детектовану довжину хвилі у відповідний нуклеотид. Завдяки цьому генерується хроматограма (електрофореграма) та встановлюється повна нуклеотидна послідовність досліджуваного фрагмента ДНК.

Підготуйте прилад до роботи згідно інструкції виробника та проведіть капілярний електрофорез зі стандартними параметрами.

Біоінформатичний аналіз для визначення генотипу вірусу АЧС за геном B646L

Етап 1. Оцінка якості секвенування та редагування хроматограм

Дія: Відкрийте отримані файли з результатами секвенування (зазвичай у форматі .ab1 або .scf) за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення (наприклад, Chromas, FinchTV, BioEdit).

Мета: Візуально оцінити якість піків. Кожен нуклеотид має бути представлений чітким поодиноким піком без "шуму" на фоні.

Редагування: Видаліть кінцеві фрагменти послідовності (5'- та 3'-кінці), які мають низьку якість (перекриття піків, слабкий сигнал), щоб уникнути включення помилкових нуклеотидів у подальший аналіз.

Етап 2. Формування консенсусної послідовності

Дія: Завантажте очищені хроматограми прямого та зворотного зчитувань у

програму (наприклад, UGENE або BioEdit) та виконайте парне вирівнювання (pairwise alignment) прямої та зворотно-комплементарної послідовностей.

Мета: Отримати єдину (консенсусну) нуклеотидну послідовність високої достовірності. Неспівпадіння між двома ланцюгами перевіряються за хроматограмами і коригуються вручну. Збережіть отриману послідовність у форматі FASTA.

Етап 3. Первинна ідентифікація за допомогою алгоритму BLAST

Дія: Використайте інструмент BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) на базі Національного центру біотехнологічної інформації США (NCBI). Вставте вашу консенсусну послідовність у поле запиту.

Мета: Підтвердити, що відсеквенований фрагмент дійсно належить вірусу АЧС (ген *B646L*), та знайти найбільш споріднені ізоляти у світовій базі даних GenBank. Зверніть увагу на показники *Per. Ident* (відсоток ідентичності) та *Query Cover* (покриття послідовності).

Етап 4. Створення набору референсних послідовностей

Дія: Завантажте з бази даних GenBank еталонні (референсні) послідовності гену *B646L* для всіх відомих 24 генотипів вірусу АЧС у форматі FASTA.

Етап 5. Множинне вирівнювання послідовностей (Multiple Sequence Alignment)

Дія: Об'єднайте вашу консенсусну послідовність та референсні послідовності в один FASTA-файл. Завантажте цей файл у програму для молекулярно-еволюційного аналізу (найпопулярнішою є програма MEGA – Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

Мета: Виконати множинне вирівнювання за допомогою алгоритмів MUSCLE або ClustalW. Програма автоматично зіставить гомологічні ділянки нуклеотидів. Після вирівнювання обріжте кінці так, щоб усі послідовності мали однакову довжину.

Етап 6. Побудова філогенетичного дерева

Дія: У програмі MEGA перейдіть до розділу "Phylogeny" та оберіть метод побудови дерева. Для АЧС найчастіше використовують метод Neighbor-Joining

(NJ) або Maximum Likelihood (ML).

Параметри: Модель нуклеотидних заміщень: зазвичай Kimura 2-parameter (K2P) або Maximum Composite Likelihood.

○ Статистична оцінка: Bootstrap test (не менше 1000 реплікацій) для перевірки достовірності топології дерева.

Етап 7. Інтерпретація результатів (Визначення генотипу)

Дія: Проаналізуйте отримане філогенетичне дерево.

Висновок: Генотип досліджуваного зразка визначається за тим, з яким референсним генотипом ваша послідовність утворює спільну гілку (кластер).

Критерій достовірності: Кластеризація повинна підтверджуватися високим показником бутстрепу (зазвичай >70-80% у вузлах галуження). Якщо ваша послідовність групується, наприклад, з референсним штамом Georgia 2007/1 (генотип II) з високою підтримкою, ваш ізолят належить до генотипу II.

Диференціювання вірусу АЧС в межах II генотипу

Суть методу полягає у секвенуванні ділянок геному вірусу АЧС, в яких науковці найчастіше виявляють мутації і по комбінації мутацій диференціюють різні ізоляти вірусу АЧС в межах II генотипу.

Для диференціювання вірусу АЧС в межах II генотипу використовують генетичні маркери зазначені у таблиці 25.

Таблиця 25

Генетичні маркери для диференціювання вірусу АЧС в межах II генотипу

№ п/п	Ділянка геному	Виявлені мутації	Секвенування
1	CVR	4 варіанти/ численні TRS ¹ та SNP ²	Фрагмент гену B602L
2	IGR I178R-I329L	4 варіанти/ численні TRS	Міжгенна ділянка I178R-I329L
3	MGF	9 варіантів/ численні TRS	Міжгенна ділянка MGF505
4	K145R	2 варіанти/ SNP	Фрагмент гену K145R
5	O174L	4 варіанти/ численні TRS та SNP	Ген O174L
6	ECO2I329L-I215L	4 варіанти/ SNP	Міжгенна ділянка та фрагмент гену I215L

¹ TRS - повтори тандемних послідовностей;

² 2 SNP – однонуклеотидний поліморфізм

7.2 Диференціювання ізолятів вірусу АЧС в межах II генотипу шляхом проведення секвенування за методом Сенгера

Реактиви

- Набір реагентів для ампліфікації ДНК: Platinum™ SuperFi II Green PCR Master Mix, Invitrogen;
- Праймери (20 мкМ)

Таблиця 26

Послідовність нуклеотидів праймерів

Назва праймера	Послідовність	Довжина фрагменту
CVR1	ACTTTGAAACAGGAAACWAATGATG	491 пн
CVR2	ATATTTTGTAAATATGTGGGCTGCTG	
Eco1A	CTATTTATCCCCRCCTTTGG	356 пн
Eco1B	TCGTCATCCTGAGACAGCAG	
O147L-F	TGGCTCAGACGATATTTCAACTC	673 пн
O147L-R	GCCTCCACCACTTGAACCAT	
K145R-F	TTTCAGGCTGAAAACCTTTTAT	282 пн
K145R-R	AAAGTTTCAATGGTTGTTAGC	
505U	AGAAACCGCAGATGAATGTA	551 пн
505L	TACAGCCCTAGTTGTTGAAG	
Eco2A	TCCTACCTGTTAAGCCACTTCC	604 пн
Eco2B	GCAAATGTGGATGCAGCTAA	

Решта реактивів такі ж, як і для проведення генотипування вірусу АЧС за методом Сенгера.

Реакційні суміші готують згідно з таблицями 27-32.

Таблиця 27

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	2X Platinum™ SuperFi™ II Green PCR Master Mix	2X	1X	12,5
2	Прямий праймер CVR1	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
3	Зворотний праймер CVR2	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
4	Water, nuclease-free	-	-	10
Загальний об'єм суміші				23,0

Таблиця 28

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	2X Platinum™ SuperFi™ II Green PCR Master Mix	2X	1X	12,5
2	Прямий праймер Eco1A	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
3	Зворотний праймер Eco1B	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
4	Water, nuclease-free	-	-	10
Загальний об'єм суміші				23,0

Таблиця 29

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	2X Platinum™ SuperFi™ II Green PCR Master Mix	2X	1X	12,5
2	Прямий праймер O147L-F	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
3	Зворотний праймер O147L-R	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
4	Water, nuclease-free	-	-	10
Загальний об'єм суміші				23,0

Таблиця 30

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	2X Platinum™ SuperFi™ II Green PCR Master Mix	2X	1X	12,5
2	Прямий праймер K145R-F	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
3	Зворотний праймер K145R-R	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
4	Water, nuclease-free	-	-	10
Загальний об'єм суміші				23,0

Таблиця 31

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	2X Platinum™ SuperFi™ II Green PCR Master Mix	2X	1X	12,5
2	Прямий праймер 505U	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
3	Зворотний праймер 505L	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
4	Water, nuclease-free	-	-	10
Загальний об'єм суміші				23,0

Таблиця 32

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	2X Platinum™ SuperFi™ II Green PCR Master Mix	2X	1X	12,5
2	Прямий праймер Eco2A	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
3	Зворотний праймер Eco2B	20 мкМ	0,2 мкМ	0,25
4	Water, nuclease-free	-	-	10
Загальний об'єм суміші				23,0

Реакційні суміші вносять в пробірки/лунки плашки по 23 мкл.

До 23,0 мкл реакційної суміші додайте 2 мкл досліджуваного зразка/контролю.

Пробірки/ плашку поміщають в ампліфікатор. Запускають програму ампліфікації з наступними параметрами:

Таблиця 33

Параметри ампліфікації

	Етап	Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Ініціалізація	98 °C -30 с	1
2. Циклювання	Денатурація	98 °C-10 с	40
	Відпал	62 °C-30 с	
	Елонгація	72 °C-30с	
3. Утримування	Додаткова елонгація	72 °C-7 хв.	1
4. Утримування		4 °C ∞	1

Виділення ДНК з агарозного гелю або очищення ПЛР продукту проводять згідно ЕТАПУ 4 розділу 7.

Вимірювання концентрації ДНК і оцінка чистоти розчину ДНК проводять згідно ЕТАПУ 5 розділу 7.

ЕТАП 6. Проведення секвенувальної ПЛР

Реакційні суміші готують згідно з таблицями 34-39.

Таблиця 34

Реакційна суміш для проведення секвенувальної ПЛР

CVR1		CVR2	
Праймер CVR1 (3,2pmol)	1 мкл	Праймер CVR2 (3,2pmol)	1 мкл
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл	BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл
Вода вільна від нуклеаз	10 мкл	Вода вільна від нуклеаз	10 мкл
Зразок ДНК	1 мкл	Зразок ДНК	1 мкл
Загальний об'єм	20 мкл	Загальний об'єм	20 мкл

Таблиця 35

Реакційна суміш для проведення секвенувальної ПЛР

Eco1A		Eco1B	
Праймер Eco1A (3,2pmol)	1 мкл	Праймер Eco1B (3,2pmol)	1 мкл
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл	BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл
Вода вільна від нуклеаз	10 мкл	Вода вільна від нуклеаз	10 мкл
Зразок ДНК	1 мкл	Зразок ДНК	1 мкл
Загальний об'єм	20 мкл	Загальний об'єм	20 мкл

Таблиця 36

Реакційна суміш для проведення секвенувальної ПЛР

O147L-F		O147L-R	
Праймер O147L-F (3,2pmol)	1 мкл	Праймер O147L-R (3,2pmol)	1 мкл
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл	BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл
Вода вільна від нуклеаз	10 мкл	Вода вільна від нуклеаз	10 мкл
Зразок ДНК	1 мкл	Зразок ДНК	1 мкл
Загальний об'єм	20 мкл	Загальний об'єм	20 мкл

Таблиця 37

Реакційна суміш для проведення секвенувальної ПЛР

K145R-F		K145R-R	
Праймер K145R-F (3,2pmol)	1 мкл	Праймер K145R-R (3,2pmol)	1 мкл
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл	BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл
Вода вільна від нуклеаз	10 мкл	Вода вільна від нуклеаз	10 мкл
Зразок ДНК	1 мкл	Зразок ДНК	1 мкл
Загальний об'єм	20 мкл	Загальний об'єм	20 мкл

Таблиця 38

Реакційна суміш для проведення секвенувальної ПЛР

505U		505L	
Праймер 505U (3,2pmol)	1 мкл	Праймер 505L (3,2pmol)	1 мкл
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл	BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл
Вода вільна від нуклеаз	10 мкл	Вода вільна від нуклеаз	10 мкл
Зразок ДНК	1 мкл	Зразок ДНК	1 мкл
Загальний об'єм	20 мкл	Загальний об'єм	20 мкл

Таблиця 39

Реакційна суміш для проведення секвенувальної ПЛР

Eco2A		Eco2B	
Праймер Eco2A (3,2pmol)	1 мкл	Праймер Eco2B (3,2pmol)	1 мкл
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл	BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл
Вода вільна від нуклеаз	10 мкл	Вода вільна від нуклеаз	10 мкл
Зразок ДНК	1 мкл	Зразок ДНК	1 мкл
Загальний об'єм	20 мкл	Загальний об'єм	20 мкл

Пробірки/ плашку поміщають в ампліфікатор. Запускають програму ампліфікації з наступними параметрами.

Таблиця 40

Параметри ампліфікації

Етап		Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Ініціалізація	95 °C -1 хв	1
2. Циклювання	Денатурація	95 °C-10 с	40
	Відпал	50 °C-5 с	
	Елонгація	60 °C-4 хв.	
4. Утримування		4 °C ∞	1

Очищення ПЛР продукту після секвенувальної ПЛР проводять згідно ЕТАПУ 7 розділу 7.

Проведення капілярного електрофорезу і визначення нуклеотидної послідовності ДНК проводять згідно ЕТАПУ 8 розділу 7.

Біоінформатичний аналіз результатів секвенування

Етап 1. Оцінка якості хроматограм та обрізання кінців (Quality Control & Trimming)

Оскільки метод Сенгера часто дає "шум" (накладання піків) на самому початку (перші 20-40 п.н.) та наприкінці реакції через виснаження реагентів, ці ділянки потрібно видалити перед подальшим аналізом.

Програма: Chromas, FinchTV, SnapGene Viewer або інтегровані модулі в UGENE / MEGA.

Вхідні дані: Файли у форматі .ab1 (містить саму хроматограму – кольорові піки флуоресценції) та .seq (текстова послідовність) для прямого (F) та

зворотного (R) праймерів кожного зразка.

Дія: Дослідник візуально перевіряє хроматограму. Кожен нуклеотид має бути представлений одним чітким, високим піком без накладання інших кольорів. Низькоякісні ділянки на початку та в кінці видаляються. Також на цьому етапі обов'язково видаляються послідовності самих праймерів, щоб вони не вплинули на аналіз.

Результат: Очищені нуклеотидні послідовності прямого та зворотного напрямків, які містять лише достовірний сигнал.

Етап 2. Збирання консенсусу з прямих та зворотних рідів (Contig Assembly)

Для надійності кожен амплікон зазвичай секвенують з обох боків: прямим праймером (наприклад, CVR1) та зворотним (CVR2). Їх потрібно об'єднати в одну послідовність.

Програма: UGENE, MEGA, BioEdit (модуль CAP3).

Вхідні дані: Очищені послідовності прямого та зворотного зчитувань для одного маркера (зразка).

Дія: Програма автоматично будує зворотно-комплементарну копію (reverse-complement) для зворотного зчитування і виконує парне вирівнювання (pairwise alignment) з прямим зчитуванням. Якщо в зоні перекриття виникають розбіжності (програма показує конфлікт), дослідник відкриває вихідні .ab1 файли і візуально вирішує, якому піку довіряти більше.

Результат: Єдина, високоякісна консенсусна послідовність (у форматі .fasta) для кожного з 6 маркерів (CVR, Eco1, O147L, K145R, 505, Eco2) конкретного ізоляту.

Етап 3. Множинне вирівнювання з референсом (Multiple Sequence Alignment)

Тепер отриману консенсусну послідовність потрібно порівняти з еталоном для пошуку генетичних маркерів.

Програма: Алгоритми MUSCLE або ClustalW (інтегровані в MEGA, UGENE, BioEdit або AliView).

Вхідні дані: Ваші отримані консенсусні .fasta файли та еталонна послідовність штаму Georgia 2007/1 (GenBank: FR682468.2).

Дія: Програма вирівнює ваш консенсус паралельно з еталонною послідовністю. Вона розміщує ідентичні нуклеотиди один під одним і вставляє прогалини (зазвичай позначаються знаком тире "-"), якщо виявляє відсутні ділянки (делеції) або додаткові вставки (інсерції).

Результат: Матриця вирівнювання, візуально підготовлена для ідентифікації мутацій.

Етап 4. Ідентифікація мутацій та генотипування (Variant Analysis)

У випадку методу Сенгера цей етап виконується напівавтоматично або повністю візуально дослідником безпосередньо у програмі для вирівнювання.

Програма: Візуальний інтерфейс MEGA або UGENE.

Вхідні дані: Матриця вирівнювання з попереднього кроку.

Дія: Дослідник "проходить" по вирівнюванню та шукає цільові зміни:

K145R (282 п.н.) та Eco2 (604 п.н.): Аналіз точкових мутацій (SNP). Якщо програма показує заміну, дослідник *обов'язково* перевіряє цей нуклеотид на вихідній хроматограмі (.ab1), щоб переконатися, що це справжня мутація, а не фоновий шум або артефакт полімерази.

O147L (673 п.н.): Візуальний пошук вставки (інсерції) специфічного тандемного повтору CAGTAGTGATTTTT (14 п.н.) порівняно з референсом.

Eco1 (356 п.н.): Підрахунок кількості повторів 10 п.н. (GGAATATATA) у міжгенній ділянці.

CVR (491 п.н.): Трансляція нуклеотидної послідовності в амінокислотну (in silico) та підрахунок тетрамерних повторів.

MGF 505 (551 п.н.): Аналіз інсерцій/делецій (InDels) та точкових замін.

Результат: Остаточний зафіксований набір мутацій для кожного маркера, що дозволяє сформувати комплексний генетичний профіль ізоляту (наприклад, CVR-I / IGR-II / O174L-I / MGF-I / K145R-I / ECO2-II) для його просторово-часової кластеризації.

Диференціювання вірусу АЧС в межах II генотипу

1. Загальний принцип системи диференціювання

Система диференціювання вірусу АЧС в межах II генотипу базується на виявленні мутацій у специфічних (гіперваріабельних) ділянках геному. Оскільки базовий рівень мутацій вірусу дуже низький, класифікація здійснюється шляхом порівняння отриманих консенсусних послідовностей ізоляту з референсним штамом Georgia 2007/1 (GenBank: FR682468).

Диференціювання відбувається за ідентифікацією двох основних типів генетичних змін:

- Зміна кількості тандемних повторів (TRS - Tandem Repeat Sequences): інсерції або делеції (InDels) певних тандемних повторів. Цей механізм найбільш властивий для маркерів CVR, IGR, та частково MGF і O174L.

- Однонуклеотидний поліморфізм (SNP - Single Nucleotide Polymorphism): точкові мутації (заміни нуклеотидів). Характерно для маркерів K145R, ECO2, та специфічних підваріантів інших генів.

2. Біоінформатична обробка даних (Процедура)

1. Вирівнювання (Alignment): Вирівнювання отриманих консенсусних послідовностей з відповідними ділянками референсного штаму Georgia 2007/1 за допомогою алгоритмів ClustalW або MUSCLE (з використанням програм MEGA, BioEdit, AliView тощо).

2. Ідентифікація мутацій: Автоматизований або візуальний пошук SNP та InDels у цільових локусів відносно референсу.

3. Аналіз специфічних генетичних маркерів

Для точної паспортизації ізоляту аналізується кожен з відсеквенованих маркерів за такими критеріями:

- CVR (Центральна варіабельна ділянка гена B602L):

Принцип: Аналіз кількості та послідовності амінокислотних тетрамерних повторів.

Процедура: Нуклеотидну послідовність транслують в амінокислотну (In silico). Порівнюють кількість та тип тетрамерів (наприклад, CAST, CADT,

NVDT) з референсом. Визначається номер підваріанту (наприклад, CVR-1) та наявність специфічних SNP.

- *IGR (I73R-I329L):*

Принцип: Аналіз кількості тандемних повторів розміром 10 пар нуклеотидів (GGAATATATA).

Процедура: Проводиться підрахунок кількості тандемних повторів. Якщо кількість повторів ідентична Georgia 2007/1 (2 касети) – це класифікується як IGR-I. Наявність одного додаткового повтору класифікується як IGR-II, двох додаткових – IGR-III тощо.

- *O174L (Ген або його IGR ділянка):*

- *Принцип:* Пошук вставки специфічного тандемного повтору розміром 14 п.н. (CAGTAGTGATTTTTT) або точкових мутацій.

Процедура: Наявність зазначеної інсерції визначає ізолят як O174L-варіант II. Гомологія з референсним штамом залишає його у статусі O174L-варіант I.

- *MGF (зазвичай IGR MGF 505-9R/10R або ділянка MGF 505-5R):*

Принцип: Пошук TRS-інсерцій (наприклад, тандемний повтор з 17 п.н. AGTAGTTCAGTTAAGAT) або специфічних SNP.

Процедура: Визначається варіант (MGF-I, MGF-II тощо) на основі кількості тандемних повторів або фіксується наявність точкової мутації, характерної для регіональних кластерів.

- *K145R:*

Принцип: Виявлення одонуклеотидного поліморфізму (SNP).

Процедура: Пошук точкових замін нуклеотидів. Наявність специфічних мутацій диференціює ізолят до K145R-варіанту II, тоді як відсутність мутацій – до варіанту I.

- *ECO2 (Міжгенна ділянка I329L-I215L):*

Принцип: Пошук SNP у даній ділянці.

Процедура: Фіксуються точкові мутації для присвоєння варіанту (ECO2-I, ECO2-II).

4. Комплексне мультилокусне профілювання (Формування кластера)

Після роздільного аналізу кожного маркера формується зведений генетичний профіль ізоляту.

- *Формат профілю:* Записується у вигляді комбінації ідентифікованих варіантів. *Приклад:* CVR-I / IGR-II / O174L-I / MGF-I / K145R-I / ECO2-II.
- *Просторово-часова кластеризація:* На основі отриманого комплексного профілю ізолят відноситься до одного з генетичних кластерів (згідно з актуальною системою класифікації, де наразі описано понад 24 генетичні кластери вірусу АЧС II генотипу). Це фінальний етап, який дозволяє встановити ймовірне джерело занесення вірусу, напрямок його поширення та епідеміологічні зв'язки між географічно віддаленими спалахами.

7.3 Диференціювання ізолятів вірусу АЧС в межах II генотипу проведенням секвенування шляхом синтезу

Реагенти

- Набір реагентів для ампліфікації ДНК: Platinum™ SuperFi II Green PCR Master Mix, Invitrogen;
- Nextera XT Library Prep Kit, illumina;
- Purification beads, illumina;
- DNA/RNA UD Indexes Set A, illumina;
- Праймери (20 мкМ)

Таблиця 41

Послідовність нуклеотидів праймерів

Назва праймера	Послідовність	Довжина фрагменту
CVR1	ACTTTGAAACAGGAAACWAATGATG	491 пн
CVR2	ATATTTTGTAATATGTGGGCTGCTG	
Eco1A	CTATTTATCCCCRCCTTTGG	356 пн
Eco1B	TCGTCATCCTGAGACAGCAG	
O147L-F	TGGCTCAGACGATATTTCAACTC	673 пн
O147L-R	GCCTCCACCACTTGAACCAT	
K145R-F	TTTCAGGCTGAAAACCTTTTAT	282 пн
K145R-R	AAAGTTTTCAATGGTTGTTAGC	
505U	AGAAACCGCAGATGAATGTA	551 пн
505L	TACAGCCCTAGTTGTTGAAG	
Eco2A	TCCTACCTGTTAAGCCACTTCC	604 пн
Eco2B	GCAAATGTGGATGCAGCTAA	

Процедура проведення дослідження

1. Накопичення фрагменту ДНК, який буде секвеновано проводять так само як і при диференціюванні ізолятів вірусу АЧС в межах II генотипу шляхом проведенням секвенування за методом Сенгера.

2. Підготовку ампліфікованих фрагментів ДНК вірусу АЧС (створення секвенувальних ДНК-бібліотек) для подальшого аналізу методом секвенування шляхом синтезу здійснюють із застосуванням набору реагентів Nextera XT Library Prep Kit.

У наборі використовується модифікована транспозома, яка дозволяє за один етап фрагментувати ДНК та одночасно приєднати адаптерні послідовності. У процесі ПЛР ці адаптерні послідовності використовуються для ампліфікації цільових фрагментів ДНК. На етапі ПЛР до обох кінців ДНК також додаються індексні адаптерні послідовності, що забезпечує можливість подвійного індексованого секвенування об'єднаних бібліотек на платформах секвенування від компанії illumina.

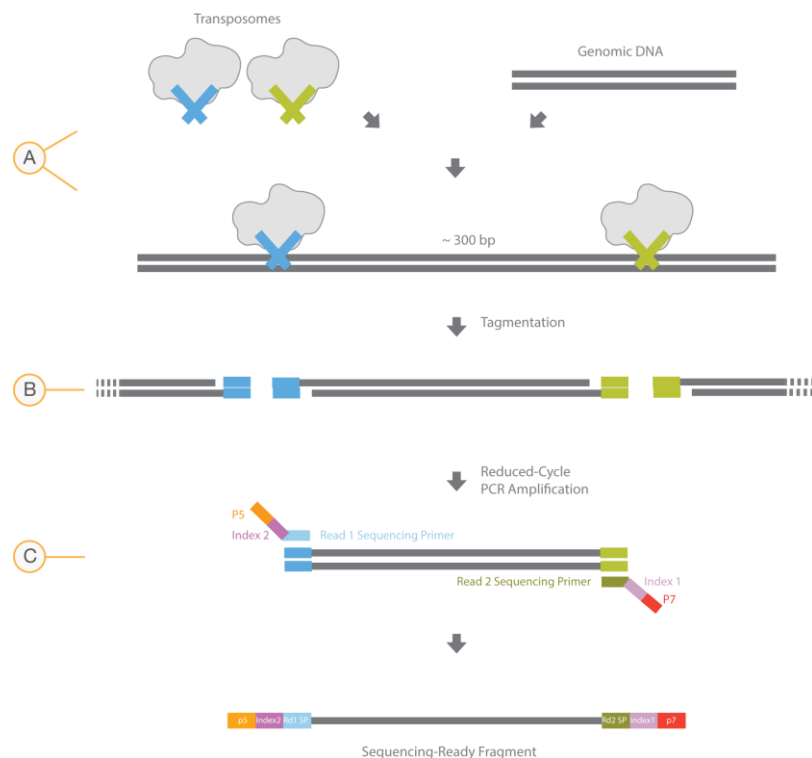


Рис. 1 Етапи підготовки ДНК бібліотеки: А) Транспозома Nextera XT з адаптерами в поєднанні з матричною ДНК; В) Фрагментація та додавання адаптерів; С) ПЛР для додавання послідовностей індексних адаптерів

Рекомендації щодо вихідної ДНК

Набір оптимізовано для приготування ДНК бібліотеки із 1 нг вихідної ДНК. Перед підготовкою бібліотек слід провести кількісне вимірювання вихідної концентрації ДНК.

Перевірте чистоту ДНК, щоб переконатися, що вихідний зразок ДНК не містить більше ніж 1 мМ ЕДТК та не містить органічних домішок, таких як фенол чи етанол. Ці речовини можуть перешкоджати реакції тагментації і призвести до незадовільних результатів секвенування.

Кількісне визначення вихідної ДНК

Ферментативна фрагментація ДНК, що використовується в цьому протоколі, є більш чутливою до кількості вихідної ДНК порівняно з механічною фрагментацією. Результати секвенування залежать від точного кількісного визначення вихідної ДНК.

Для кількісного визначення вихідної ДНК використовуйте флуорометричний метод. Наприклад, якщо ви використовуєте систему Qubit dsDNA BR Assay, додайте 2 мкл кожного зразка ДНК до 198 мкл робочого розчину Qubit. Уникайте методів, що вимірюють загальну кількість НК, таких як NanoDrop або інші методи вимірювання поглинання довжини хвиль в УФ-діапазоні.

Оцінка чистоти ДНК

Абсорбція в УФ-діапазоні є поширеним методом оцінки чистоти зразка ДНК. Співвідношення абсорбції при 260 нм до абсорбції при 280 нм дає уявлення про чистоту зразка. Цей протокол оптимізовано для ДНК із значеннями співвідношення абсорбції 260/280 у діапазоні 1,8–2,0, що вказує на чистий зразок ДНК.

Для додаткової оцінки чистоти зразка використовуйте співвідношення поглинання при 260 нм до поглинання при 230 нм. Слід прагнути до співвідношення 260/230 у межах 2,0–2,2. Значення поза цим діапазоном вказують на наявність забруднювачів.

Розведіть вихідний зразок ДНК у 10 мМ Tris-HCl, pH 7,5–8,5.

Неповна тагментація, спричинена забруднювачами, може призвести до неякісної підготовки бібліотеки, поганої кластеризації або низької якості результатів секвенування.

Компоненти набору для підготовки ДНК бібліотек Nextera XT Library Prep Kit містяться у двох коробках (таблиці 42 і 43).

Таблиця 42

Вміст коробки 1

Кількість пробірок		Акронім	Назва реагенту	Умови зберігання
24 зразки	96 зразків			
1	1	ATM	Amplicon Tagment Mix	-25°C - -15°C
1	2	TD	Tagment DNA Buffer	-25°C - -15°C
1	1	NPM	Nextera PCR Master Mix	-25°C - -15°C
1	4	RSB	Resuspension Buffer	-25°C - -15°C
1	1	LNA1	Library Normalization Additives 1	-25°C - -15°C
1	2	LNW1	Library Normalization Wash 1	2°C - 8°C

Таблиця 43

Вміст коробки 2

Кількість пробірок		Акронім	Назва реагенту	Умови зберігання
24 зразки	96 зразків			
1	1	NT	Neutralize Tagment Buffer	Кімнатна температура
1	1	LNB1	Library Normalization Beads 1	2°C - 8°C
1	1	LNS	Library Normalization Storage Buffer 1	Кімнатна температура

Ці реагенти транспортуються при температурі від -25 °C до -15 °C. Для забезпечення належної ефективності реагентів їх слід негайно помістити на зберігання при зазначеній температурі.

Вміст набору DNA/RNA UD Indexes Set A: 96 лункова плашка із 96 індексами. Зберігати при температурі від -25 °C до -15 °C.

Протокол дослідження

Рисунок 2 ілюструє процес підготовки бібліотеки ДНК Nextera XT. Між етапами позначено безпечні точки зупинки.

Орієнтовний час розраховано на обробку 8 зразків.

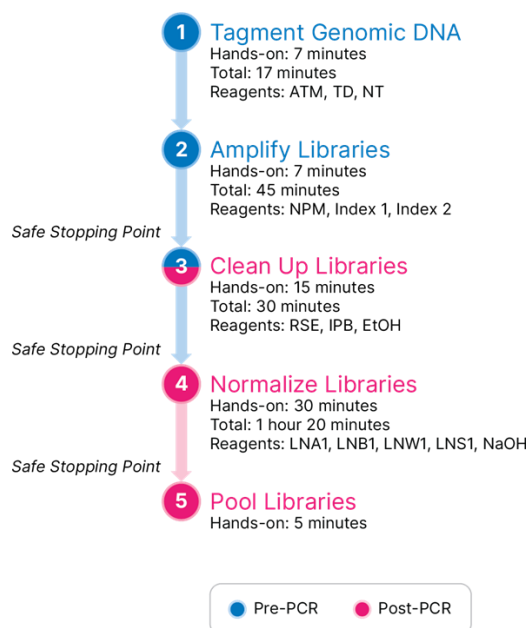


Рис. 2 Процес підготовки ДНК бібліотеки

Запобігання перехресній контамінації

- Під час додавання або перенесення зразків чи вихідних сумішей реагентів міняйте наконечники між кожним зразком.

- Під час додавання індексних адаптерів за допомогою багатоканальної піпетки змінюйте наконечники між кожним рядком або колонкою. Якщо використовуєте одноканальну піпетку, змінюйте наконечники між кожним зразком.

Ресуспендування магнітних частинок (IPB)

Магнітні частинки слід перемішувати вручну шляхом перевертання.

1. Перемішайте флакон з магнітними частинками шляхом перевертання зі швидкістю не менше одного перевертання на секунду.

2. Кожні 30 секунд повертайте флакон на 90 градусів. Загальний час перевертання 2 хвилини.

3. Після закінчення цього часу візуально огляньте внутрішню частину флакона на наявність прикріплених частинок до стінок флакону.

4. Якщо на внутрішніх стінках флакону немає залишків частинок, їх можна вважати повністю ресуспендованими.

5. Якщо на внутрішніх стінках все ще є магнітні частинки, повторіть крок змішування ще протягом 1 хвилини.

6. Проведіть повторний візуальний огляд стінок ємності, щоб переконатися в повному перемішуванні. За необхідності повторіть крок перемішування (5).

Підготовка плашки з індексами IDT для Illumina DNA/RNA Unique Dual (UD)

- Центрифугуйте плашку при $1000 \times g$ протягом 1 хвилини, щоб рідина осіла на дно плашки.

- Проколіть фольгову пломбу на плашці з індексними адаптерами, використовуючи новий наконечник піпетки для кожної лунки лише для тієї кількості зразків, для яких готується ДНК бібліотека.

Тагментація ДНК

На цьому етапі одночасно відбувається фрагментування ДНК та приєднання адаптерів.

Витратні матеріали:

- ATM (Amplicon Tagment Mix);
- TD (Tagment DNA Buffer);
- NT (Neutralize Tagment Buffer);
- стріповані пробірки по 8 шт;
- кришки для стріпованих пробірок.

Підготовка

1. Підготуйте наступні реактиви, зазначені у таблиці 44.

Таблиця 44

Реактиви для тагментації

Реагент	Умови зберігання	Інструкція
ATM	-25°C - -15°C	Розморозьте на льоду. Переверніть розморожені пробірки 3–5 разів, а потім коротко відцентрифугуйте.
TD	-25°C - -15°C	Розморозьте на льоду. Переверніть розморожені пробірки 3–5 разів, а потім коротко відцентрифугуйте.
NT	15°C - 30°C	Перевірте наявність осаду. Якщо він є, перемішайте на вортексі, доки всі частинки не розчиняться.

2. Запрограмуйте на ампліфікаторі параметри зазначені у таблиці 45 (TAG

програма).

- Виберіть опцію попереднього нагрівання кришки та встановіть температуру 100 °C.

- Встановіть об'єм реакції 50 мкл.

Таблиця 45

Параметри тагментації (TAG програма)

Етап	Режим	Кількість циклів
1. Утримування	55 °C - 5 хв	1
2. Утримування	10 °C	1

Порядок виконання

1. У пробірки додайте по 10 мкл TD та 5 мкл ДНК(1 нг) в зазначеному порядку.

2. Перемішайте піпеткою.

3. Додайте в кожну лунку 5 мкл АТМ.

4. Перемішайте піпеткою 10 разів, а потім закрийте пробірку.

5. Центрифугуйте при $280 \times g$ при 20 °C протягом 1 хвилини.

6. Помістіть на заздалегідь запрограмований термоциклер і запусіть програму TAG. Коли програма досягне 10 °C, негайно перейдіть до кроку 7, оскільки транспозома все ще активна.

7. Додайте 5 мкл NT у кожну пробірку.

8. 10 разів перемішайте піпеткою, а потім закрийте пробірки.

9. Центрифугуйте при $280 \times g$ при 20 °C протягом 1 хвилини.

10. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 5 хвилин.

Ампліфікація бібліотек

На цьому етапі відбувається ампліфікація ДНК з адаптерами за допомогою ПЛР. Під час етапу ПЛР додаються адаптери Index 1 (i7), адаптери Index 2 (i5) та нуклеотидні послідовності, необхідні для формування кластерів для секвенування.

Витратні матеріали:

- NPM (Nextera PCR Master Mix);

- Індексні адаптери;

- кришки до стріпованих пробірок.

Підготовка

1. Підготуйте реагенти згідно з таблицею 46.

Таблиця 46

Реагенти для ампліфікації ДНК з адаптерами

Реагент	Умови зберігання	Інструкції
Index adapters	-25°C - -15°C	Розморожуйте при кімнатній температурі. Перед використанням коротко процентрифугуйте.
NPM	-25°C - -15°C	Розморожуйте на льоду протягом 20 хвилин.

2. Запрограмуйте на термоциклері параметри ампліфікації зазначені у таблиці 47 (програма ПЛР NXT).

- Виберіть опцію попереднього нагрівання кришки та встановіть температуру 100 °C

- Встановіть об'єм реакції 50 мкл.

Таблиця 47

Параметри ампліфікації ДНК з адаптерами

Етап	Режим	Кількість циклів
1. Утримування	72 °C - 3 хв	1
2. Утримування	95 °C - 30 с	1
3. Циклювання	95 °C - 10 с	12
	55 °C - 30 с	
	55 °C - 30 с	
	72 °C - 30 с	
4. Утримування	72 °C - 3 хв	1
4. Утримування	10 °C ∞	1

Порядок дій

1. Додайте до кожної проби 10 мкл індексного адаптера.

2. Додайте по 15 мкл NPM у кожен лунку.

3. 10 разів перемішайте піпеткою, а потім закрийте пробірки.

4. Центрифугуйте при $280 \times g$ і температурі 20 °C протягом 1 хвилини.

5. Помістіть пробірки у заздалегідь налаштований термоциклер і запусіть програму NXT PCR.

МІСЦЕ БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ

Якщо ви припиняєте роботу, герметично закрийте пробірки і зберігайте їх

при температурі від 2 °C до 8 °C не більше 2 днів. Як альтернатива, залиште пробірки у термоциклері на ніч.

Очищення бібліотек

На цьому етапі для очищення ампліфікованих бібліотек використовується очищення за допомогою магнітних частинок.

Витратні матеріали

- IPB (очисні магнітні частинки);
- EtOH (свіжоприготований 80% етанол);
- RSB (буфер для ресуспензії);
- Вода вільна від нуклеаз;
- стріповані пробірки по 8 шт;
- кришки для стріпованих пробірок.

Підготовка

1. Підготуйте наступні реактиви, зазначені у таблиці 48.

Таблиця 48

Реактиви для очищення ДНК бібліотеки

Реагенти	Умови зберігання	Інструкції
IPB	15°C – 30°C	-Перед використанням повинні мати кімнатну температуру. -Перед кожним використанням ресуспендуйте. -Регулярно ресуспендуйте, щоб переконатися, що магнітні частинки розподілені рівномірно. -Через в'язкість розчину аспіруйте та дозуйте повільно.
RSB	-25°C – -15°C	Розморозьте та доведіть до кімнатної температури. Перемішайте за допомогою струшувача. Після розморожування RSB можна зберігати при температурі від 2 °C до 8 °C.

2. Приготуйте свіжий 80 % розчин етанолу з абсолютного етанолу.

Порядок виконання

1. Центрифугуйте при $280 \times g$ за температури 20 °C протягом 1 хвилини, щоб зібрати вміст на дні лунки.
2. Перенесіть супернатант з кожної пробірки у відповідні нові пробірки.
3. Додайте магнітні частинки у співвідношенні зазначеному в таблиці 49.

Співвідношення ДНК бібліотеки до магнітних частинок

Довжина ампліконів	Рекомендоване співвідношення магнітних частинок	Об'єм суспензії магнітних частинок
300–500	1.8x IPB	90
> 500	0.6x IPB (0.5x IPB for $\geq 2 \times 250$ cycles)	30 (25 μ l for $\geq 2 \times 250$ cycles)

5. Закрийте пробірки та струсіть на шейкері при 1800 об/хв протягом 2 хвилин.

6. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 5 хвилин.

7. Поставте пробірки на магнітний штатив та зачекайте, доки рідина не стане прозорою (~2 хвилини).

8. Не порушуючи осад магнітних частинок, видаліть весь супернатант.

9. Промийте двічі 200 мкл 80% EtOH наступним чином:

- Помістіть пробірки на магнітний штатив, додайте 200 мкл свіжого 80% EtOH, не змішуючи.

- Інкубуйте протягом 30 секунд.

- Не порушуючи положення магнітних частинок, видаліть весь супернатант.

10. За допомогою 20-мкл піпетки видаліть залишки етанолу.

11. Висушіть магнітні частинки на магнітному штативі протягом 15 хвилин.

12. Вийміть пробірки з магнітного штативу.

13. Додайте до магнітних частинок 52,5 мкл RSB.

14. Закрийте та струсіть пробірки при 1800 об/хв протягом 2 хвилин

15. Витримайте при кімнатній температурі протягом 2 хвилин.

16. Поставте пробірки у магнітний штатив та зачекайте, доки рідина не стане прозорою (~2 хвилини).

17. Перенесіть 50 мкл супернатанту в нові пробірки.

БЕЗПЕЧНА ТОЧКА ЗУПИНКИ

Якщо ви зупиняєте процес, закрийте пробірки кришками та зберігайте при температурі від -25 °C до -15 °C не більше 7 днів.

Перевірка якості бібліотеки

Проаналізуйте 1 мкл нерозведеної бібліотеки на біоаналізаторі Agilent Technology 2100, використовуючи набір для високочутливого аналізу ДНК.

Типові бібліотеки демонструють широкий розподіл розмірів у діапазоні ~250–1000 п.н., як показано на рисунку 3 (верхній графік). Можна секвенувати різні бібліотеки із середнім розміром фрагментів від 250 до 1500 п.н. (нижній графік).

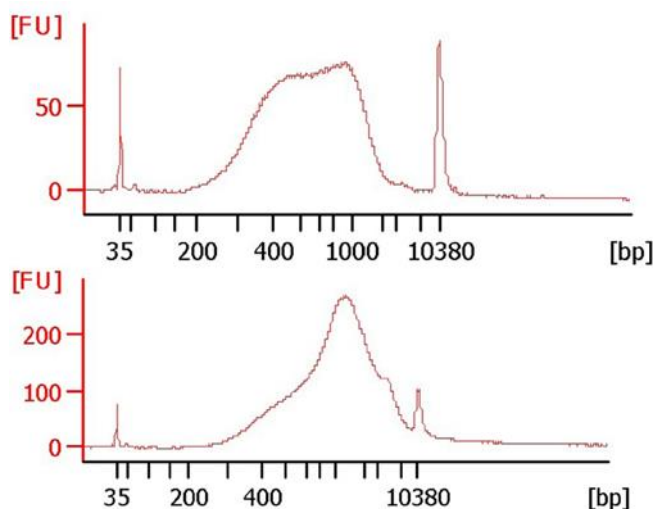


Рис.3. Приклад кривої біоаналізатора

Показники якості

Два фактори можуть спричиняти коливання щільності кластерів у бібліотеках, підготовлених за допомогою набору Nextera XT DNA Library Prep:

- Занадто великий або занадто малий середній розмір зразка після тагментації.
- Занадто низька кінцева концентрація зразка через низький вихід на початку етапу нормалізації з використанням мікросфер.

Для усунення коливань щільності кластерів рекомендується перевірити розмір та концентрацію бібліотеки.

Перевірка розміру бібліотеки

Більші молекули кластеризуються менш ефективно, ніж менші. Якщо розмір фрагментів після тагментації перевищує очікуваний, можлива низька

кількість кластерів. Зворотне також можливе. Середній очікуваний розмір бібліотеки після тагментації становить від 400 п.н. до 1,2 кб.

Виміряйте концентрацію бібліотеки за допомогою високочутливого приладу dsDNA Qubit після очищення бібліотеки, а також визначте розмір бібліотеки за допомогою приладу TapeStation, Agilent для розрахунку молярності.

Якщо ви починаєте з високоякісної ДНК і спостерігаєте низький вихід після очищення бібліотеки, можливі проблеми з очищенням IPB або етапом ампліфікації. Якщо результати вказують на будь-яку з цих умов, переконайтеся, що мастер-мікс для ПЛР зберігається належним чином при температурі від -25 °C до -15 °C у морозильній камері. Переконайтеся, що кількість циклів заморожування-розморожування є мінімальною.

Нормалізація бібліотек

Процедура

1. Розрахуйте молярність бібліотеки або об'єднаних бібліотек за такою формулою.

- Для бібліотек, довжини фрагментів яких виміряні за допомогою приладів використовуйте середній розмір бібліотеки.

- Якщо прилад для аналізу довжин фрагментів не доступний, використовуйте 600 п.н. як середній розмір бібліотеки.

$$\frac{\text{concentration in ng/}\mu\text{l}}{660 \text{ g/mol} \times \text{average library size in bp}} \times 10^6 = \text{Molarity (nM)}$$

2. Використовуючи значення молярності, обчисліть об'єми RSB та бібліотеки, необхідні для розведення бібліотек до початкової концентрації, визначеної для вашої системи.

3. Розведіть бібліотеки за допомогою RSB:

- *Якщо кількісне визначення проводили для вже сформованого мультиплексного пулу:* розведіть увесь пул до цільової початкової концентрації, рекомендованої для вашої системи секвенування.

- *Якщо кількісне визначення проводили для кожної бібліотеки індивідуально:* спочатку розведіть кожну бібліотеку окремо до цільової початкової концентрації, рекомендованої для вашої системи секвенування. Після цього відберіть по 10 мкл кожної розведеної бібліотеки та внесіть їх у нову мікропробірку для формування єдиного мультиплексного пулу.

4. Здійсніть денатурацію та розведення пулу бібліотек до кінцевої завантажувальної концентрації, суворо дотримуючись інструкцій виробника для вашої моделі секвенатора:

Для платформи iSeq 100: процедуру розведення виконуйте згідно з посібником користувача (процес денатурації бібліотек відбувається автоматично на борту приладу).

Для платформи NovaSeq 6000: інструкції щодо об'єднання пулів та їхньої денатурації наведено у відповідному посібнику користувача.

Для платформ HiSeq 4000 та HiSeq 3000: протокол підготовки реагентів викладено в настанові до систем кластеризації cBot або cBot 2.

Для інших систем секвенування: керуйтеся загальним посібником виробника щодо денатурації та розведення ДНК-бібліотек.

Примітка: Залежно від специфіки вашого лабораторного процесу та застосованого методу кількісного аналізу, цільові концентрації можуть потребувати оптимізації. Її здійснюють за результатами наступних запусків секвенування або шляхом попереднього титрування проточної комірки.

Біоінформатичний аналіз результатів секвенування

Етап1. Демультіплексування (Demultiplexing)

Програма: bcl2fastq або bcl-convert (зазвичай запускається автоматично на секвенаторі або локальному сервері).

Результат: Пара файлів R1.fastq.gz та R2.fastq.gz для кожного зразка.

Етап 2. Оцінка первинної якості зчитувань (Quality Control)

Мета: Визначення вихідної якості секвенування, наявності адаптерів та рівня дуплікації.

Програма: “FastQC” (v0.11.9 або новіша), “MultiQC”.

Алгоритм дій:

1. Запустити аналіз для всіх парних файлів “.fastq.gz”.
2. Згенерувати зведений звіт за допомогою “MultiQC”.

Критерії прийнятності: Середній показник якості Phred (Q-score) > 30 для більшості зчитувань.

Етап 3. Тримінг та фільтрація (Trimming and Filtering)

Мета: Видалення специфічних адаптерів Nextera (“CTGTCTCTTATACACATCT”), відсікання низькоякісних кінців зчитувань та видалення занадто коротких фрагментів.

Програма: “fastp”.

Параметри фільтрації:

- Відсікання основ із якістю нижче Q20.
- Видалення зчитувань, коротших за 36 пн (наслідок гіпертагментації).

Приклад команди:

```
fastp -i sample_R1.fastq.gz -I sample_R2.fastq.gz \
-o sample_clean_R1.fastq.gz -O sample_clean_R2.fastq.gz \
--detect_adapter_for_pe --cut_right --cut_right_window_size 4 \
--cut_right_mean_quality 20 -l 36
```

Результат: Пара очищених файлів “clean_R1.fastq.gz” та “clean_R2.fastq.gz”.

Етап 4. Картування на референсну послідовність (Mapping)

Мета: Вирівнювання очищених зчитувань на референсний геном (наприклад, Georgia 2007/1) або об'єднаний файл цільових послідовностей.

Програма: “BWA-MEM” (v0.7.17), “SAMtools”.

Алгоритм дій:

1. Індексція референсу:

Приклад команди:

```
bwa index reference.fasta
```

2. Картування з утворенням файлу вирівнювання (BAM):

Приклад команди:

```
bwa mem -t 8 reference.fasta sample_clean_R1.fastq.gz sample_clean_R2.fastq.gz |  
samtools view -Sb - > sample.bam
```

3. Сортування та індексація BAM-файлу:

Приклад команди:

```
samtools sort sample.bam -o sample_sorted.bam  
samtools index sample_sorted.bam
```

Етап 5. Маскування послідовностей праймерів (Primer Soft-Clipping)

Мета: Виключення нуклеотидів, що походять із синтетичних праймерів (CVR1/2, O147L тощо), з подальшого аналізу. Праймери можуть приховувати реальні мутації, оскільки містять послідовність референсу.

Програма: “iVar” (v1.3.1).

Вимоги: Наявність файлу у форматі “BED”, що містить точні координати кожного праймера відносно референсної послідовності.

Приклад команди:

```
ivar trim -i sample_sorted.bam -b primers.bed -p sample_trimmed -q 15 -m 30 -e
```

Результат: Файл “sample_trimmed.bam”, у якому послідовності праймерів ігноруються при пошуку мутацій (soft-clipped). Цей файл потрібно відсортувати та проіндексувати через “SAMtools”.

Етап 6. Оцінка глибини покриття (Coverage Analysis)

Мета: Перевірка ефективності ампліфікації кожного з цільових фрагментів (CVR, Eco1, O147L, K145R, 505, Eco2).

Програма: “Mosdepth”.

Приклад команди:

```
mosdepth -b target_regions.bed sample_coverage sample_trimmed_sorted.bam
```

Критерії прийнятності: Для достовірного генотипування мінімальна глибина покриття у цільових регіонах повинна становити $\geq 30\times$.

Етап 7. Ідентифікація генетичних варіантів (Variant Calling)

Мета: Пошук однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) та коротких інделів (вставок/делецій) у досліджуваному зразку відносно референсу.

Програма: “FreeBayes” або “LoFreq” (рекомендується для вірусних популяцій із низькою частотою алелей).

Приклад команди (приклад FreeBayes):

```
freebayes -f reference.fasta -p 1 sample_trimmed_sorted.bam > sample_variants.vcf
```

Фільтрація варіантів: Залишати лише варіанти з якістю (QUAL) > 20 та глибиною покриття (DP) > 30 за допомогою “bcftools filter”.

Диференціювання вірусу АЧС в межах II генотипу проводять так само як зазначено у розділі 7.2.

7.4 Диференціювання ізолятів вірусу АЧС в межах II генотипу шляхом проведенням секвенування на основі технології нанопор

Зразки:

Накопичення фрагменту ДНК, який буде секвеновано проводять так само як і при диференціюванні ізолятів вірусу АЧС в межах II генотипу шляхом проведення секвенування за методом Сенгера. Перед підготовленням ДНК бібліотек зразки ДНК (амплікони) розводять до концентрації 100 fmol.

Витратні матеріали:

- Набір для нативного баркодування та секвенування (V14): SQK-NBD114.24 (містить баркоди NB01-NB24, адаптери NA, буфери для секвенування та заправки);
- Проточна комірка (Flow Cell): R10.4.1 FLO-MIN114;
- BSA (Бичачий сироватковий альбумін, 50 мг/мл) (обов'язково для V14);
- Магнітні частинки Agencourt AMPure XP;
- NEBNext FFPE суміш для відновлення (M6630);
- Модуль NEBNext для відновлення кінців ДНК і безматричного 3'-аденілірування (E7546);
- Готова суміш NEB для лігування субстратів з тупими / липкими кінцями (M0367);
- Модуль NEBNext для швидкого лігування (E6056);

- Пробірки 1.5 мл Eppendorf DNA LoBind;
- Аналітичні пробірки Qubit (ThermoFisher, кат.№ Q32856);
- Аналітичний набір Qubit (рекомендуємо dsDNA HS, ThermoFisher, кат.№ Q32851);
- Вода без нуклеази (ThermoFisher, кат.№ AM9937);
- 80% етанол свіжоприготовлений у воді без нуклеази (1,2 мл/зразок).

Обладнання:

- Магнітний штатив, сумісний з 1,5 мл пробірками Eppendorf;
- Мікроцентрифуга;
- Вортекс;
- 2 термостата (37°C та 65°C);
- Кріюштатив або контейнер з льодом;
- Таймер;
- Піпетки та наконечники до них: P2, P20, P200, P1000;
- Флюорометр ThermoFisher Qubit;
- Спектрофотометр DS-11 FX, Denovix або аналог.

Підготовка зразків

Ці примітки відносяться до всіх кроків очищення з використанням SPRI магнітних частинок, зазначених у даному документі:

- Перед початком: необхідно витримати магнітні частинки Agencourt AMPure XP за кімнатної температури протягом 30 хвилин.
- Під час внесення магнітних частинок уникайте залишку крапель суспензії в наконечнику дозатора. При одночасній обробці понад трьох зразків ДНК вихідну суспензію магнітних частинок необхідно періодично гомогенізувати на вортексі після внесення до кожних трьох зразків.
- Етанол слід додавати повільно, по стіні, протилежній до осаду.
- Можна використовувати менший об'єм етанолу, але він повинен повністю покривати

Очищення з використанням SPRI магнітних частинок:

1. Встановіть температуру на термостаті 37°C.
2. Підготуйте 80% етанол (0,4 мл / зразок).
3. Перемішайте на вортексі магнітні частинки AMPure XP та додайте об'єм, рівний вашому ПЛР продукту (співвідношення 1:1), перемішайте струшуючи та процентрифугуйте на мікроцентрифузі,
4. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 5 хвилин.

5. Частинки сформують осад у магнітному штативі. Тримайте пробірки у магнітному штативі, поки елюат не стане прозорим. Потім обережно відберіть та вилийте супернатант за допомогою піпетки (не порушуючи осаду).

6. Тримайте пробірки у магнітному штативі, промийте частинки 200 мкл свіжоприготованого 80% етанолу, не порушуючи осаду. Видаліть етанол за допомогою піпетки.

7. Повторіть етап промивання етанолом.

8. Процентрифугуйте пробірки у мікроцентрифузі та поставте у магнітний штатив. За допомогою піпетки видаліть залишки етанолу і дайте осаду просохнути протягом 1-3 хвилин (до втрати блиску), але не пересушіть осад до розтріскування.

9. Вийміть пробірки з магнітного штативу та ресуспендуйте осад у 25 мкл води без нуклеази. Інкубуйте протягом 5 хвилин при 37°C. Відцентрифугуйте пробірки на мікроцентрифузі.

10. Тримайте пробірки у магнітному штативі, поки елюат не стане прозорим.

11. Відберіть 25 мкл елюату в чисту 1,5 мл пробірку (Eppendorf DNA LoBind).

Визначення концентрації ДНК на флуориметрі Qubit:

Вимірювання проводять згідно з інструкцією виробника, дотримуючись такого алгоритму:

1. Підготовка стандартів та зразків: У марковані аналітичні пробірки (0,5 мл) внесіть робочий розчин флуорофора. Для калібрування підготуйте два стандарти (190 мкл робочого розчину + 10 мкл відповідного стандарту). Для дослідних зразків внесіть 198–199 мкл робочого розчину та додайте 1–2 мкл досліджуваної ДНК.

2. Інкубація: Гомогенізуйте суміші на вортексі протягом 3–5 секунд та інкубуйте 2 хвилини за кімнатної температури.

3. Калібрування та вимірювання: Відкалібруйте прилад, послідовно зчитавши Стандарт №1 та Стандарт №2. Після цього виміряйте концентрацію

дослідних зразків, попередньо вказавши в меню приладу внесений об'єм ДНК (1 або 2 мкл), та зафіксуйте результати.

Перевірка чистоти на спектрофотометрі

1. Використайте воду без нуклеази в якості контролю.
2. Приступайте до вимірювання оптичної щільності очищених продуктів

ПЛР:

- OD 260/280 (ціль >1,8; прийнятний $\geq 1,7$),
- OD 260/230 (ціль 2,0-2,2; прийнятний $\geq 1,8$).

Примітка: На цьому етапі протокол може бути зупинений. Зберігайте зразки за 4 ° C.

Перед початком протоколу лігування:

1. Необхідно витримати магнітні частинки Agencourt AMPure XP за кімнатної температури протягом 30 хвилин.
2. Необхідно витримати проточну комірку за кімнатної температури протягом 30 хвилин.
3. Встановити 2 термостата на температуру 37°C та 65°C відповідно.
4. Підготуйте 80% етанол (0.8 мл / зразок).

Перевірте свою проточну комірку:

1. Під'єднайте MinION, проточну комірку та комп'ютер:
 - Після успішного підключення, ви побачите світло і почуєте вентилятор.
2. Відкрийте графічний інтерфейс MinKNOW через ярлик на робочому столі, під'єднайте пристрій MinION до комп'ютера.
3. Виберіть тип проточної комірки зі списку. Потім позначте проточну комірку як Selected (Вибрано):
 - Натисніть Check flow cells (Перевірити проточну комірку) в нижній частині екрана.
4. Натисніть "Start test" (Почати тест).

5. Перевірте кількість активних пор, доступних для експерименту, їх кількість відображається на панелі System history (Архів системи), після завершення перевірки.

Протокол лігування та баркодування

Примітка: 100 фмолів кожного зразка амплікону буде оброблено на цьому першому етапі. Протокол можна зупинити після етапу підготовки кінців або лігування баркодів (зберігати зразки за 4 °C).

Відновлення та підготовка кінців ДНК:

1. Для кожного баркоду приготуйте наступну суміш в пробірці Eppendorf LoBind:

- 48 мкл ДНК для кожного зразка;
- 3,5 мкл NEBNext FFPE буферу для відновлення ДНК;
- 2,0 мкл NEBNext FFPE суміші для відновлення ДНК;
- 3,5 мкл Ultra II робочого буферного розчину для підготовки кінців;
- 3,0 мкл Ultra II суміші ферментів для підготовки кінців.

2. Змішайте постукуванням та відцентрифугуйте на мікроцентрифузі.

3. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 10 хвилин і при температурі 65 °C протягом 5 хвилин.

4. Очистіть за допомогою 60 мкл (1x) магнітних частинок AMPure XP згідно зі стандартним протоколом SPRI (двічі промити 80% етанолом).

5. Елюуйте у 25 мкл води без нуклеази.

Лігування унікальних баркодів (Native Barcodes NB01-NB24):

1. Для кожного зразка додайте реактиви в такому порядку (загальний об'єм 50 мкл):

- 17,9 мкл ДНК з підготовленими кінцями;
- 4,6 мкл води без нуклеази;
- 2,5 мкл унікального баркоду (NB01 - NB24);
- 25 мкл готової суміші NEB для лігування субстратів з тупими / липкими кінцями.

2. Змішайте постукуванням, відцентрифугуйте.

3. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 10 хвилин.
4. Очистіть за допомогою 60 мкл магнітних частинок AMPure XP (двічі промити 80% етанолом).
5. Елюуйте у 16 мкл води без нуклеази.

Лігування адаптера (Native Adapter - NA):

Примітка: Не використовуйте етанол 80% для кроку очищення після цього етапу, оскільки це денатурує моторні білки на адаптерах. Використовуйте буфер SFB для збереження коротких ампліконів.

1. Додайте рівні обсяги кожного зразка з баркодом до 1,5 мл пробірки Eppendorf DNA LoBind, щоб зібрати пул.
2. Додайте реактиви для лігування адаптера в такій послідовності:
 - 29,7 мкл пулу ДНК зразків з баркодами;
 - 35,3 мкл води без нуклеази;
 - 5 мкл нативного адаптера (NA);
 - 20 мкл NEBNext реакційного буферу для швидкого лігування (5x);
 - 10 мкл T4 ДНК лігази.
3. Змішайте постукуванням, відцентрифугуйте.
4. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 10 хвилин.
5. Очистіть пул за допомогою 50 мкл магнітних частинок AMPure XP.
6. **ВАЖЛИВО:** Промийте частинки двічі по 250 мкл буфером SFB (Short Fragment Buffer), ресуспендуючи їх кожного разу. Етанол не використовувати!
7. Після видалення SFB дайте осаду просохнути ~30 секунд.
8. Елюуйте у 13 мкл буферу елюції (EB). Інкубуйте 5-10 хвилин при температурі 37°C.
9. Відберіть 13 мкл елюату з фінальною бібліотекою та помістіть на лід.

Протокол для приладу MinION (Заправка та завантаження)

Підготовка реагентів:

1. Розморозьте буфер для секвенування (SQB), частинки для завантаження бібліотеки (LIB), Flow Cell Tether (FCT) та одну пробірку Flow Cell Flush (FCF).
2. Підготуйте розчин для заправки (праймінгу) проточної комірки V14:
 - До пробірки з 1170 мкл FCF додайте 30 мкл FCT та 5 мкл BSA (50 мг/мл).
 - Ретельно перемішайте піпеткою (не на вортексі).

Заправка (priming) проточної комірки:

1. Відкрийте порт для заправки (priming port). Обережно видаліть наявну бульбашку повітря (аспірувавши мікродозатором приблизно 20–30 мкл рідини).
2. Через порт для заправки повільно внесіть 800 мкл підготовленого розчину для праймінгу (FCF + FCT + BSA). Витримайте паузу тривалістю 5 хвилин.
3. Відкрийте порт SpotON. Після цього внесіть додатково 200 мкл розчину для праймінгу виключно через порт для заправки.

Увага: Вносити розчин для праймінгу через порт SpotON суворо заборонено!

Завантаження бібліотеки:

1. Ретельно перемішайте частинки LIB (Library Beads) безпосередньо перед використанням.
2. Підготуйте фінальну суміш для завантаження:
 - 37,5 мкл буфера для секвенування (SQB)
 - 25,5 мкл частинок (LIB)
 - 12,0 мкл бібліотеки ДНК
3. Обережно перемішайте піпеткою.
4. Додайте по краплях 75 мкл підготовленої бібліотеки до проточної комірки через порт SpotON.

5. Закрийте всі порти та кришку MinION.

Запуск у MinKNOW:

1. Виберіть тип проточної комірки: FLO-MIN114.
2. Вкладка «Kit»: Зі списку оберіть SQK-NBD114.24 (або SQK-LSK114, якщо вибір обмежений, але баркодування здійснюється апаратно).
3. Вкладка «Basecalling»: Оберіть режим High Accuracy (HAC) або Super Accurate (SUP) для забезпечення максимальної точності (Q20+), яку підтримує хімія V14. Увімкніть опцію «Barcoding», щоб програма автоматично розсортувала зчитані послідовності по папках відповідно до використаних баркодів (NB01-NB24).

Біоінформатичний аналіз результатів секвенування

Етап 1. Бейсколінг та Демультіплексування (Basecalling)

Найкраще робити це безпосередньо в MinKNOW під час запуску (в режимі High Accuracy або Super Accurate) або після секвенування за допомогою автономного інструменту Dorado.

Результат: Ви отримаєте окремі файли .fastq для кожного баркоду (зразка).

Важливо: Обов'язково увімкніть опції видалення нанопорових адаптерів (barcodes та секвенувальних адаптерів) на цьому етапі.

Етап 2. Фільтрація за якістю та довжиною (QC)

Цей крок критично важливий для ампліконів, щоб відсіяти химери (злиплі амплікони) та фрагментовані рідні. Оскільки цільові фрагменти мають довжину від 282 до 673 п.н., потрібно задати жорсткі рамки фільтрації.

Програма: Filtlong або Chopper.

Параметри:

- Мінімальна довжина: ~250 п.н. (щоб зберегти K145R).
- Максимальна довжина: ~750 п.н. (щоб зберегти O147L та виключити химери, довжина яких буде >1000 п.н.).
- Мінімальна якість: Q20 (оскільки хімія V14 це легко дозволяє).

Етап 3. Видалення послідовностей праймерів (Trimming)

Праймери (CVR1/2, Eco1A/B тощо) фізично присутні на кінцях відсеквенованих ампліконів. Їх обов'язково потрібно видалити перед картуванням. Якщо цього не зробити, синтетична послідовність праймера приховає будь-які реальні мутації в місцях їх посадки на референсному геномі.

Програма: Cutadapt або Porechop.

Дія: Створіть файл (FASTA) з послідовностями ваших 12 праймерів і задайте команду обрізати ці послідовності з обох кінців рідів (з допуском на 1-2 помилки).

Етап 4. Картування на референс (Mapping)

Очищені ріди картуються на еталонний геном АЧС (зазвичай Georgia 2007/1, GenBank: FR682468.2).

Програма: Minimap2.

Команда: Використовуйте пресет для нанопор: minimap2 -ax map-ont reference.fasta sample.fastq > mapped.sam.

Далі .sam файл конвертується у .bam, сортується та індексується за допомогою SAMtools.

Етап 5. Пошук генетичних варіантів (Variant Calling)

Цей етап визначає, чи є розбіжність між вашим зразком та референсним геномом реальною мутацією (SNP або InDel), чи це просто помилка секвенування. Програма аналізує "стопку" всіх відкартованих рідів у кожній позиції (наприклад, у генах K145R або Eco2) та з високою точністю фіксує справжні генетичні зміни.

Програма: Clair3 (рекомендовано для сучасної хімії V14/R10.4.1 завдяки вбудованим нейромережам) або Medaka (модуль medaka_variant).

Вхідні дані: Відсортований та індексований .bam файл (результат попереднього етапу картування) та .fasta файл референсного геному (Georgia 2007/1).

Дія: Алгоритм на основі моделей машинного навчання оцінює ймовірність кожної відмінності. Якщо у переважній більшості ваших ампліконних рідів (наприклад, >80%) на певній позиції замість референсного нуклеотиду "A" стоїть "G", або присутня вставка цілої касети повторів (як у локусі O147L), алгоритм підтверджує цю мутацію та присвоює їй бал достовірності (Quality Score).

Результат: Файл формату .vcf (Variant Call Format). Це стандартизований текстовий документ, що містить список і точні координати всіх підтверджених однонуклеотидних замін (SNP) та вставок/випадінь (InDels).

Після цього кроку файл .vcf "накладається" на референс за допомогою утиліти bcftools consensus, що і формує фінальний .fasta файл для візуального аналізу в UGENE.

Етап 6. Візуальний аналіз та типування

Фінальний етап найзручніше проводити в графічному інтерфейсі. Завантажте отримані консенсуси (.fasta) та референсний геном Georgia 2007/1 у програму UGENE.

Проведіть множинне вирівнювання (MUSCLE або MAFFT) і проаналізуйте кожен маркер:

- CVR (491 п.н.): Транслюйте нуклеотидну послідовність в амінокислотну безпосередньо в UGENE. Підрахуйте кількість тетрамерних повторів (CAST, CADT тощо).
- Eco1 (356 п.н.) / IGR I73R-I329L: Шукайте тандемні інсерції розміром 10 п.н. (GGAATATATA).
- O147L (673 п.н.): Перевірте наявність інсерції 14 п.н. (CAGTAGTGATTTTT) порівняно з референсом.
- MGF 505 (551 п.н.): Аналізуйте TRS інсерції або SNP.
- K145R (282 п.н.) та Eco2 (604 п.н.): Шукайте виключно точкові заміни нуклеотидів (SNP).

Диференціювання вірусу АЧС в межах II генотипу проводять так само як зазначено у розділі 7.2.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

В рамках організації контролю якості досліджень велику увагу необхідно приділяти розробленню та впровадженню на робочих місцях стандартних операційних процедур (СОП). З метою запобігання появі недостовірних, у тому числі хибнопозитивних результатів, необхідно:

- дотримуватися вимог щодо організації лабораторії;
- дотримуватися правил роботи персоналу з обладнанням та реактивами;
- дотримуватися вимог, зазначених в інструкціях, методичних рекомендаціях виробників використовуваних наборів реагентів;
- використовувати наступні контролю ПЛР: НКВ, ВПК, ПКА, НКА, ПЗ, НЗ та контроль оточуючого середовища – дає змогу виявити контамінацію робочих поверхонь, приладів та обладнання нуклеїновими кислотами.

НКВ, ПКА, НКА є обов'язковими та повинні використовуватися при кожній постановці ПЛР.

Також якість лабораторних досліджень забезпечується впровадженням системи управління якістю (СУЯ) відповідно до вимог ДСТУ ISO/IEC 17025. СУЯ, яка передбачає проведення внутрішньолабораторного та зовнішньолабораторного контролю якості досліджень.

Внутрішньолабораторний контроль якості. Внутрішньолабораторний контроль якості являє собою систему внутрішньолабораторних порівнянь одержаних у лабораторії результатів.

Для внутрішньолабораторного контролю якості досліджень необхідно використовувати позитивні та негативні зразки. В якості позитивних зразків можуть бути використані:

- зразки, штучно контаміновані НК;
- зашифровані проби матеріалу, уже дослідженого в лабораторії раніше;
- атестовані контрольні панелі, що містять позитивні і негативні зразки.

В якості негативних (зразки, що не містять НК) – ДНК-буфер, ФБР.

Забезпечення внутрішнього контролю якості проводять відповідно до Державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I – IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами».

Внутрішньолабораторний контроль включає такі спеціалізовані процедури:

- постійна оцінка контрольних зразків у кожній постановці (серії) ампліфікації;

- періодичне проведення повторного випробування (виконується двома операторами паралельно при зміні обладнання, спеціаліста, введенні нового набору реагентів);

- використання контрольних зразків для внутрішньолабораторного контролю якості (Цей вид контрольних процедур рекомендується проводити при вхідному контролі наборів реагентів, зміні обладнання, спеціаліста, запровадження нового набору реагентів);

- систематичне проведення контролю забруднення лабораторії продуктами ампліфікації. У разі отримання постійних позитивних сигналів у негативних контролях всі вихідні реактиви підлягають негайній заміні, необхідно провести деконтамінаційні заходи.

Зовнішній контроль якості. Зовнішній контроль якості здійснюється у формі участі у міжлабораторних порівняльних тестуваннях. У разі незадовільної оцінки отриманих результатів у лабораторії необхідно приймати екстрені заходи щодо усунення помилок.

9. КОНТАМІНАЦІЯ ДОСЛІДЖУВАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ТА РЕАКТИВІВ

Види контамінації:

- Перехресна контамінація від одного дослідного зразка до іншого – під час підготовки зразків до дослідження, виділення НК, внесення зразків в реакційну суміш;

- Контамінація НК від попередніх зразків;
- Контамінація продуктами ампліфікації (ампліконами) – має найбільше значення, оскільки амплікони в процесі ПЛР накопичуються у великій кількості і є ідеальним продуктом для реампліфікації;

- Контамінація досліджуваного матеріалу.

Основні правила попередження контамінації:

- Одноразовий лабораторний одяг в кожній лабораторній зоні;
- Одноразові перчатки без тальку;
- Наконечники з аерозольними фільтрами;
- Одноразові пластикові пробірки та посуд;
- Дотримання поточності руху досліджуваних зразків;
- Хімічна та ультрафіолетова дезінфекція всіх поверхонь робочих зон.

Дії при контамінації:

- Утилізація всіх дослідних зразків на проміжних стадіях дослідження;
- Генеральне прибирання, хімічна і ультрафіолетова дезінфекція усіх поверхонь лабораторного приміщення;
- Дезінфекція меблів, робочих поверхонь приладів і обладнання;
- Контроль наслідків контамінації шляхом взяття змивів з робочих поверхонь.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Gallardo C, Nieto R, Soler A, Pelayo V, Fernández-Pinero J, Markowska-Daniel, Pridotkas G, Nurmoja I, Granta R, Simón A, Pérez C, Martín E, Fernández-Pacheco P, Arias M. Assessment of African Swine Fever Diagnostic Techniques as a Response to the Epidemic Outbreaks in Eastern European Union Countries: How To Improve Surveillance and Control Programs. *J Clin Microbiol.* 2015 Aug;53(8):2555-65.
2. D.P. King, S.M. Reid, G.H. Hutchings, S.S. Grierson, P.J. Wilkinson, L.K. Dixon, A.D.S. Bastos, T.W. Drew. 2003. «Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African Swine Fever Virus». *J. Virol. Methods*, 107: 53-61.
3. Fernández-Pinero, J.; Gallardo, C.; Elizalde, M.; Robles, A.; Gómez, C.; Bishop, R.; Heath, L.; Couacy-Hymann, E.; Fasina, F.O.; Pelayo, V.; Soler, A.; Arias, M. (2013). *Molecular diagnosis of African swine fever (ASF) by a new real-time PCR using Universal Probe Library (UPL)*. *Transbound Emerg. Dis.*, 60: 48-58.
4. Gallardo C, Fernández-Pinero J, Arias M. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Res.* 2019 Oct 2;271:197676. doi: 10.1016/j.virusres.2019.197676. Epub 2019 Jul 27. Review.
5. Bastos ADS, Penrith ML, Cruciere C, Edrich JL, Hutchings G, Roger F, Couacy-Hymann E, Thomson GR (2003) Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch Virol* 148: 693–706
6. Boshoff CI, Bastos AD, Gerber LJ, Vosloo W. (2007). Genetic characterisation of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973-1999). *Vet Microbiol.* Mar 31;121(1-2):45-55.
7. Gallardo C, Mwaengo DM, Macharia JM, Arias M, Taracha EA, Soler A, Okoth E, Martín E, Kasiti J, Bishop RP (2009) “Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes” *Virus Genes* , Feb;38(1):85-95.
8. Nix RJ, Gallardo C, Hutchings G, Blanco E, Dixon LK. (2006). Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch Virol.* Dec;151(12):2475-94.
9. Gallardo, C., Fernández-Pinero, J., Pelayo, V., Gazeaev, I., Markowska-Daniel, I., Pridotkas, G., Nieto, R., Fernández-Pacheco, P., Bokhan, S., Nevolko, O., Drozhzhe, Z., Pérez, C., Soler, A., Kolvasov, D., & Arias, M. (2014). Genetic variation among African swine fever genotype II viruses, eastern and central Europe. *Emerging infectious diseases*, 20(9), 1544–1547. <https://doi.org/10.3201/eid2009.140554>
10. Giammarioli M, Torresi C, Biccheri R, et al. Genetic Characterization of African Swine Fever Italian Clusters in the 2022-2023 Epidemic Wave by a Multi-

Gene Approach. Viruses. 2024;16(8):1185. Published 2024 Jul 24. doi:10.3390/v16081185

11. Mazur-Panasiuk N, Walczak M, Juskiewicz M, Woźniakowski G. The Spillover of African Swine Fever in Western Poland Revealed Its Estimated Origin on the Basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR I73R/I329L Genomic Sequences. Viruses. 2020 Sep 27;12(10):1094. doi: 10.3390/v12101094. PMID: 32992547; PMCID: PMC7601147.

12. Nix, R. J., Gallardo, C., Hutchings, G., Blanco, E., & Dixon, L. K. (2006). Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. Archives of virology, 151(12), 2475–2494. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0794-z>

Сушко Микола Іванович,
завідувач науково-дослідного відділу молекулярно-генетичних досліджень Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (далі – ДНДІЛДВСЕ),
аспірант Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН України

Мандигра Світлана Станіславівна,
кандидат ветеринарних наук, старший дослідник,
старший науковий співробітник науково-дослідного відділу молекулярно-генетичних досліджень ДНДІЛДВСЕ

Романько Марина Євгенівна,
доктор біологічних наук, доцент, старший науковий співробітник.,
заступник директора з наукової роботи ДНДІЛДВСЕ

Музика Денис Васильович,
доктор ветеринарних наук, професор,
заступник директора з міжнародного співробітництва Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН України

Алексєєва Галина Борисівна,
кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник,
заступник директора з наукового забезпечення лабораторної діагностики заразних хвороб тварин ДНДІЛДВСЕ

Піщанський Олександр Вікторович,
кандидат ветеринарних наук, директор ДНДІЛДВСЕ

Підписано до друку __.__.__ р. Формат _____
Папір друк. № 2. Друк офсетний. Ум. друк. арк. ____
Тираж ____ прим. Зам. №__

Видавець: (назва підприємства)
(поштова адреса видавця)
Тел.: (телефони видавця)
E-mail: (електронна пошта видавця)