

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-203

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БАКУЛОВИРУСНОЙ ДНК С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

MEASUREMENT OF BACULOVIRUS DNA CONCENTRATION VIA QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

Н. Р. Хабибуллин, Р. Д. Якупова, Е. О. Вартанова, М. С. Меркулова, А. О. Деревянко, Ю. Ю. Ивин

*Федеральный научный центр исследований и разработки
иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва*

N. R. Khabibullin, R. D. Yakupova, E. O. Vartanova, M. S. Merkulova, A. O. Derevianko, Yu. Yu. Ivin

*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development
of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow*

✉ khabibullin_nr@chumakovs.ru

Аннотация

Получение рекомбинантных белков в бакуловирусных системах экспрессии сопровождается значительными временными затратами на стадии пассирования вируса. Определение концентрации вирусной геномной ДНК с помощью ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) позволяет частично преодолеть это ограничение. В исследовании получено уравнение линейной регрессии, позволяющее рассчитывать инфекционную активность бакуловируса на основании данных ПЦР-РВ.

Abstract

The production of recombinant proteins in baculovirus expression systems is accompanied by significant time costs, especially at the virus amplification stage. This limitation can be partially overcome if the PCR method is used for the virus titration. In this work, a linear regression plot of genome copy number versus baculovirus titers was produced.

Введение

Бакуловирусные векторные системы экспрессии (BEVS) широко используются для эффективной и биобезопасной наработки рекомбинантных белков в клетках насекомых. Ограничивающим фактором при использовании BEVS является высокая времязатратность на определение инфекционной активности при генерации вирусной массы. Использование метода ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) значительно ускоряет процесс анализа суспензии вирусных частиц с приемлемым для заражения титром.

Целью данной работы является отработка метода ПЦР-РВ оценки содержания ДНК бакуловирусов для использования при расчете инфекционной активности.

Материалы и методы

Объектом исследования были рекомбинантные бакуловирусы, полученные с помощью системы экспрессии Bac-to-Bac™ (Thermo Fisher Scientific Inc.). Концентрацию инфекционных бляшкообразующих единиц (БОЕ) бакуловирусов в культуре клеток Sf9 подсчитывали методом бляшек. Экстракцию бакуловирусной геномной ДНК из вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) осуществляли с помощью набора K-сорб (СИНТОЛ). ПЦР-РВ проводили с помощью Taq ДНК-полимеразы с «горячим стартом» (Евроген) на приборе Applied Biosystems QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Концентрацию вирусной геномной ДНК в образцах ВСЖ определяли по накоплению флуоресцентного сигнала от зонда TaqMan при амплификации участка гена *gp64* [1]. Стандарт ДНК получали путем клонирования гена *gp64* из *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) в плазмиду pFastBacDual. Концентрацию стандартной плазмидной ДНК определяли спектрофотометрически при помощи NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific Inc.). В каждую постановку ПЦР-РВ включали четыре десятикратных разведения стандарта с известной концентрацией. Количество копий анализируемых ДНК-мишеней рассчитывали по формуле, выведенной из графика калибровочной кривой. Регрессионные кривые строили по методу наименьших квадратов. Статистическую обработку данных выполняли с помощью программного обеспечения IBM SPSS Statistics. Количественные данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения.

Результаты

Типичная калибровочная кривая, получаемая из кривых амплификации десятичных разведений стандарта, представлена на рис. 1. По результатам ряда постановок эффективность ПЦР составляла $94,05 \pm 3,51$ %, коэффициент детерминации $R^2 = 0,9961 \pm 0,0036$. В отрицательном контрольном образце не наблюдалось неспецифического накопления продукта.

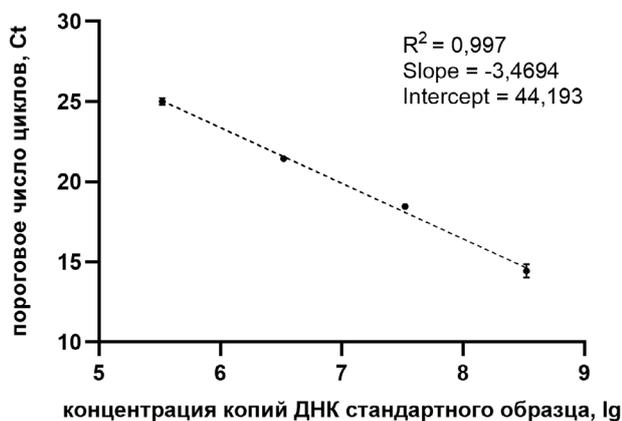


Рис. 1. Калибровочный график зависимости порогового числа циклов (cycle threshold, Ct) от концентрации копий ДНК стандартного образца

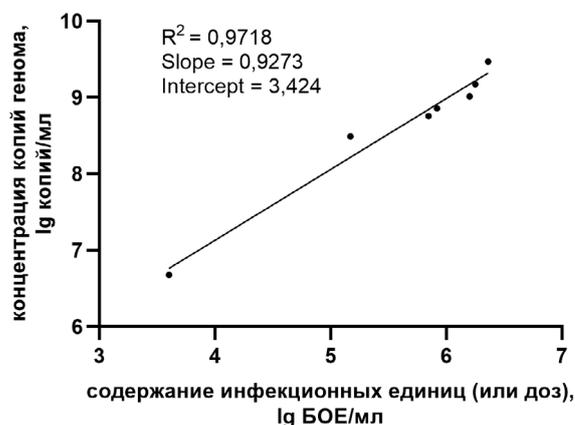


Рис. 2. Зависимость концентрации копий бакуловирусной геномной ДНК от содержания инфекционных единиц

Всего было проанализировано 7 рекомбинантных бакуловирусов, содержащих гены различных вирусных белков. Для каждого бакуловируса методом бляшек была определена концентрация инфекционных доз (которая варьировала от $10^{3,6}$ до $10^{6,4}$ БОЕ/мл), а также количество копий генома/мл ВСЖ. Регрессионная кривая, отражающая зависимость этих двух величин друг от друга, представлена на рис. 2. Коэффициент корреляции (r) равен 0,986, связь между исследуемыми признаками — прямая, теснота связи по шкале Чеддока — весьма высокая, зависимость признаков статистически значима ($P = 0,000181$). Средняя ошибка аппроксимации составляет 1,4 %, что указывает на правомерность полученного уравнения линейной регрессии. Среднее число копий генома, способное сформировать одну бляшку, составило 1110 ± 491 копий/БОЕ.

Заключение

Продемонстрирован вариант использования ПЦР-РВ для титрования бакуловирусов, что в дальнейшем позволит снизить временные затраты на наработку рекомбинантных белков в BEVS.

Литература

1. Hitchman R. B., Siaterli E. A., Nixon C. P., King L. A. Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles // Biotechnol. Bioeng. 2007. Vol. 96, No. 4. P. 810–814.