Упражнение

Удалось провести частичное секвенирование гена НА несубтипируемого вируса гриппа А.

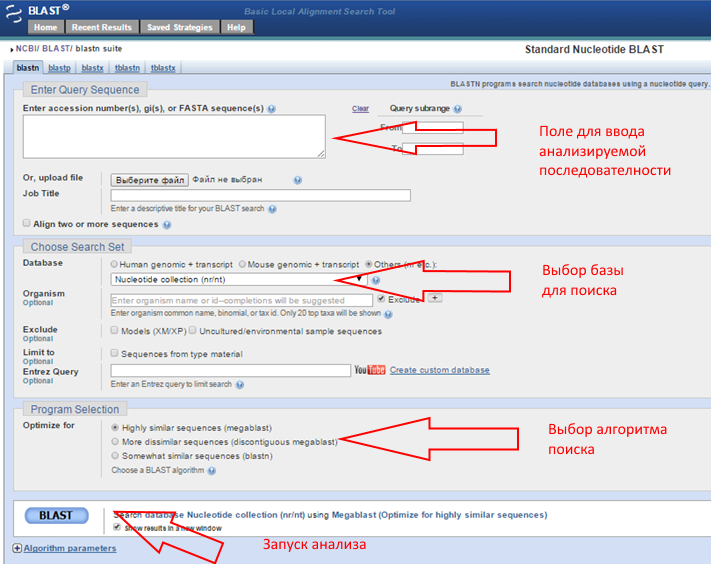
Необходимо разработать тест-систему для субтипирования вирусов данного подтипа

Полученная последовательность представлена ниже:

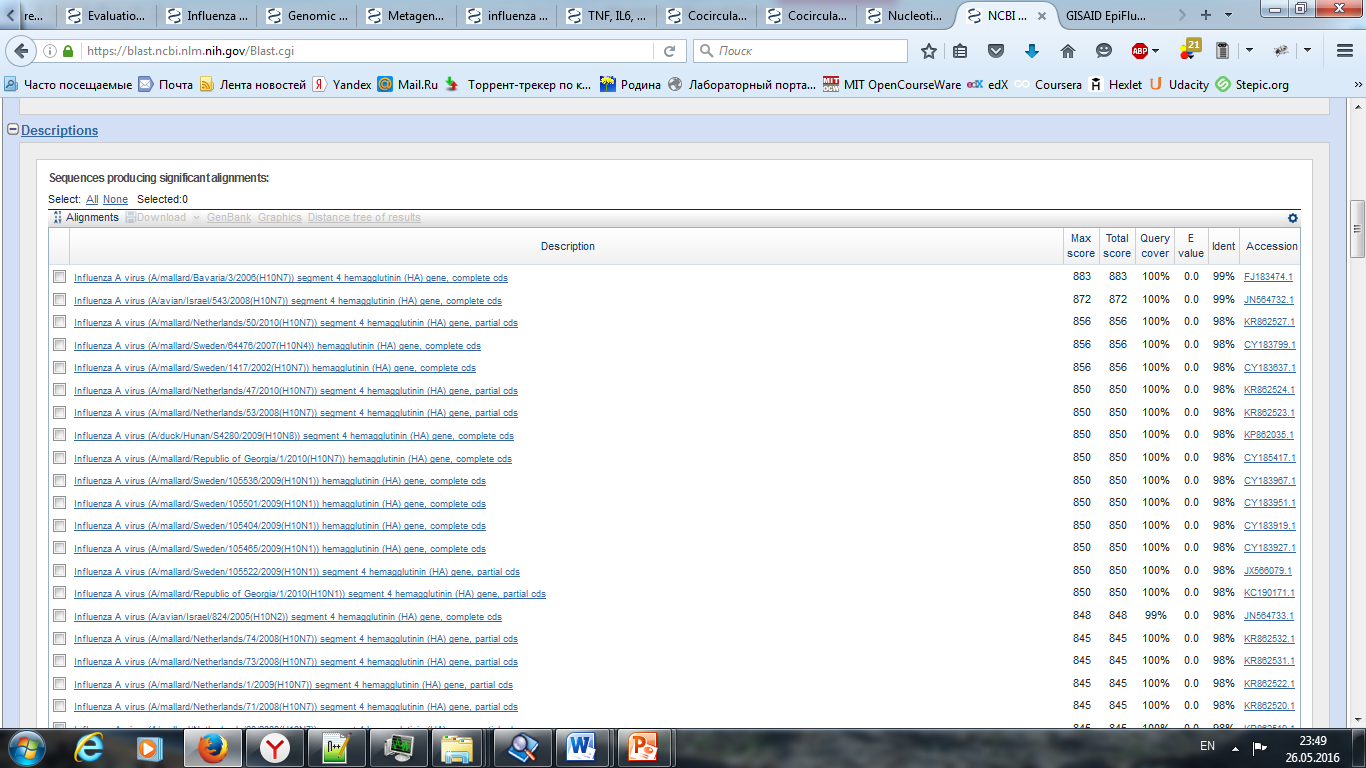
tttctatgcagagctcaaatggctagtgtcagggacaaagggacaaaatttccctcagacaacaaatacctaccggaatacggatacagcagaacatctcataatatggggaattcatccccttccagcacacaggaaaagaatgacctatacggaacgcagtcactatctatatccgttgggagttctacatatcagaacaacttcgttccagttattggggcaagacctcaggtcaatggacaaagtgggcggatcgaatttcactggacactagtacggccgggtgacaacataac

Для определения подтипа вируса воспользуемся инструментом NCBI BLASTn:

* http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi



Результат анализа

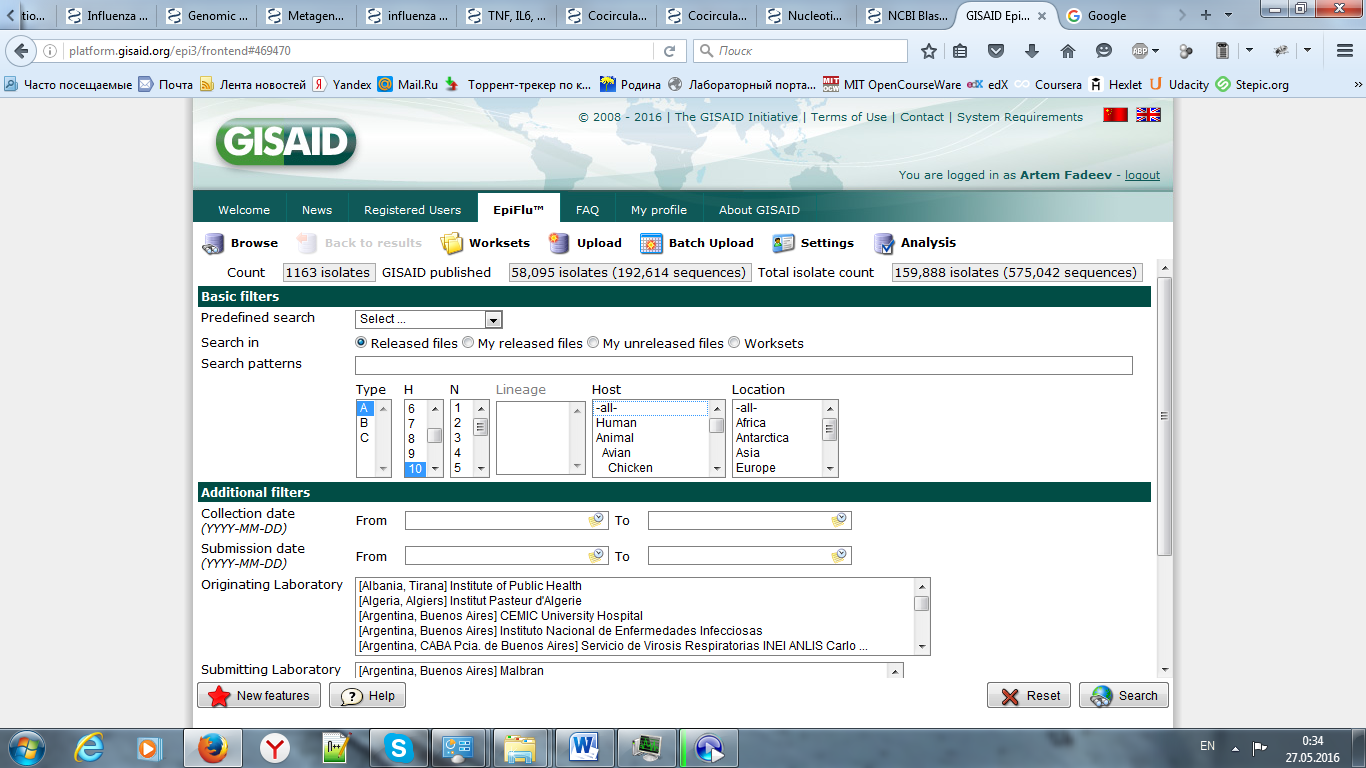


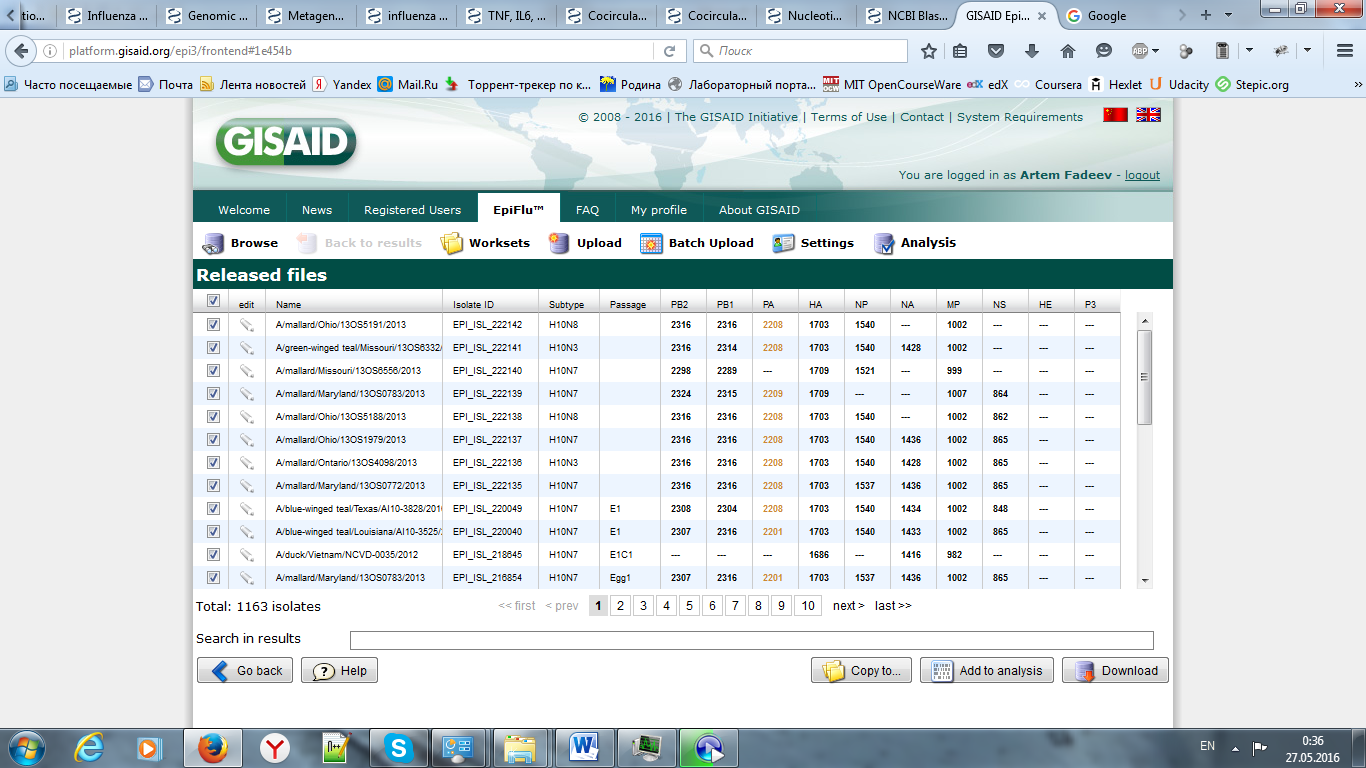
Таким образом, выявленный вирус принадлежит к подтипу А/Н10.

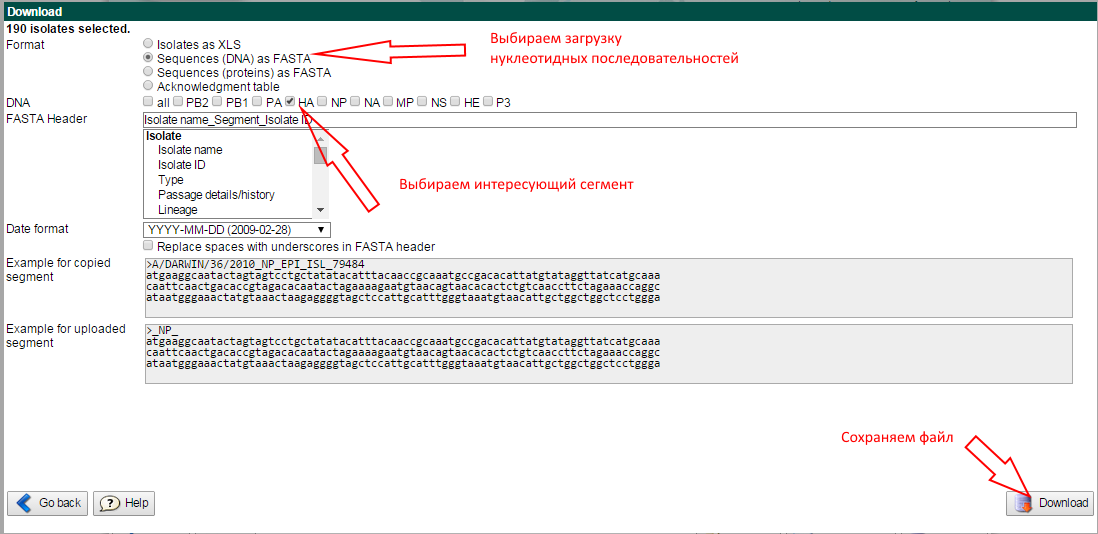
Для подбора праймеров и проб на ген НА вирусов подтипа А/Н10 необходимо оценить расположение консервативных сайтов в нуклеотидной последовательности. Для воспользуемся данными, доступными в базе данных GISAID EpiFlu.

* http://platform.gisaid.org/



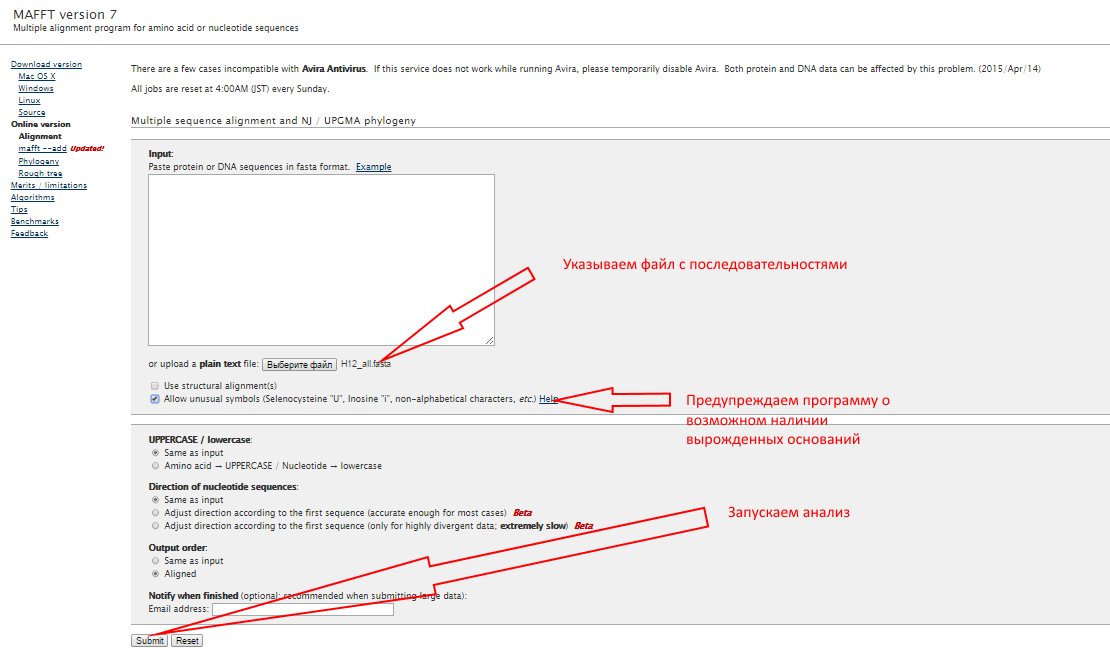


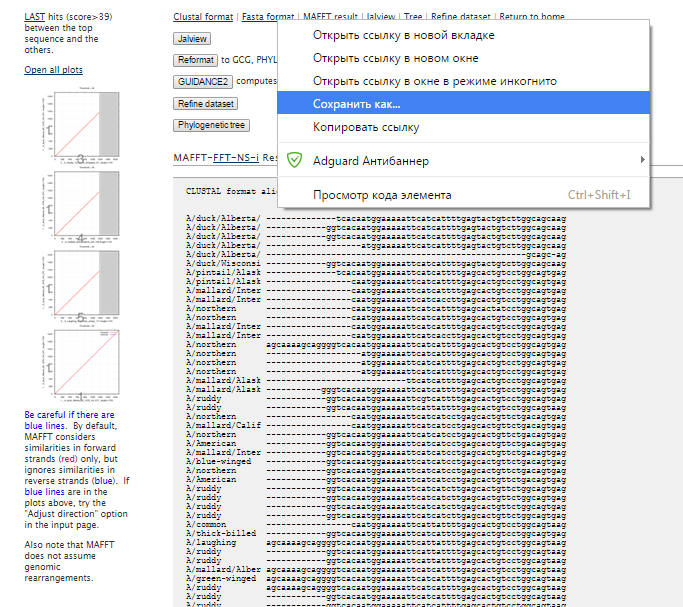




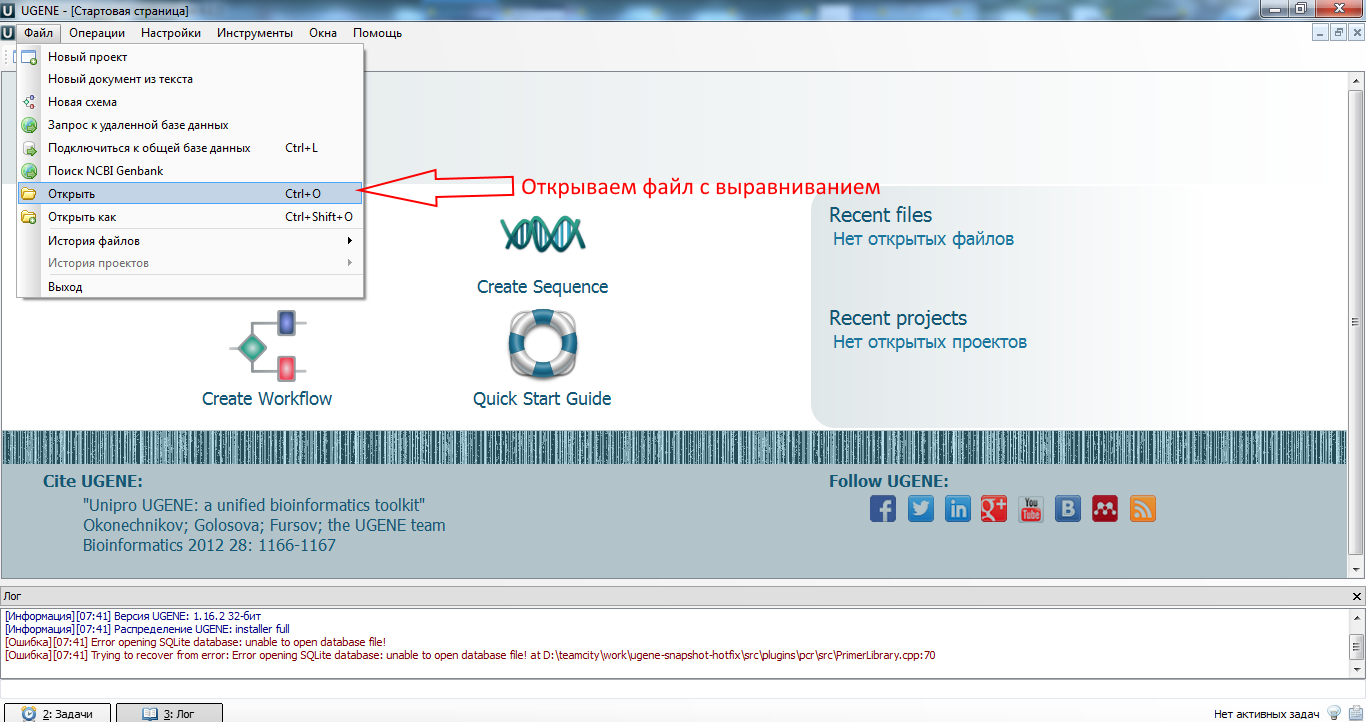
Для дальнейшего анализа полученные последовательности необходимо выровнять. Воспользуемся онлайн-сервером MAFFT

* http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/

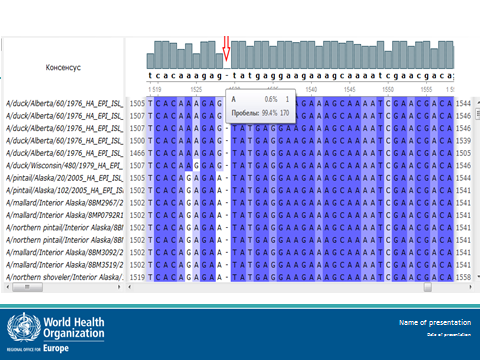
****

****

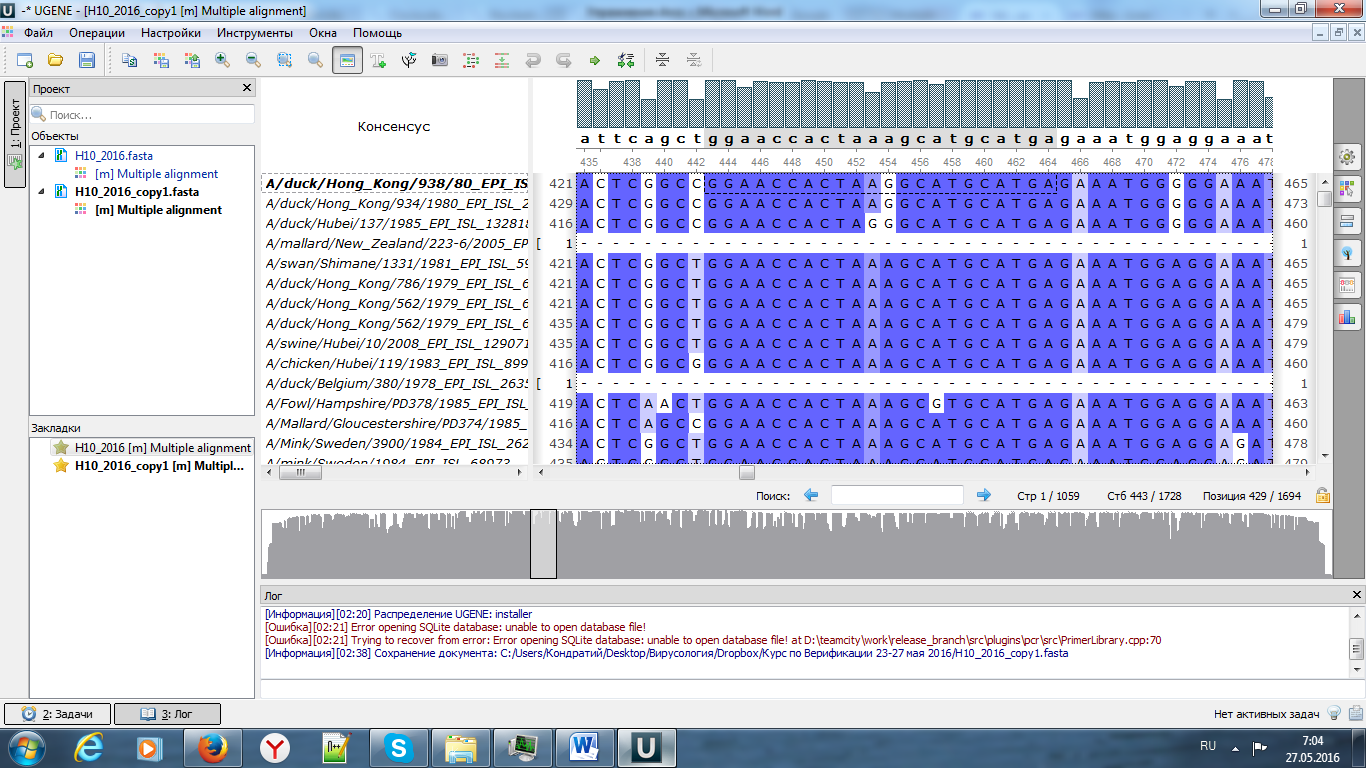
Полученное выравнивание необходимо сохранить на компьютере и открыть для редактирования в программе Ugene



Выравнивание, полученное из большого количества последовательностей обычно оказывается зашумленным случайными ошибками секвенирования, поэтому необходимо удалить столбцы, возникшие в результате таких ошибок.

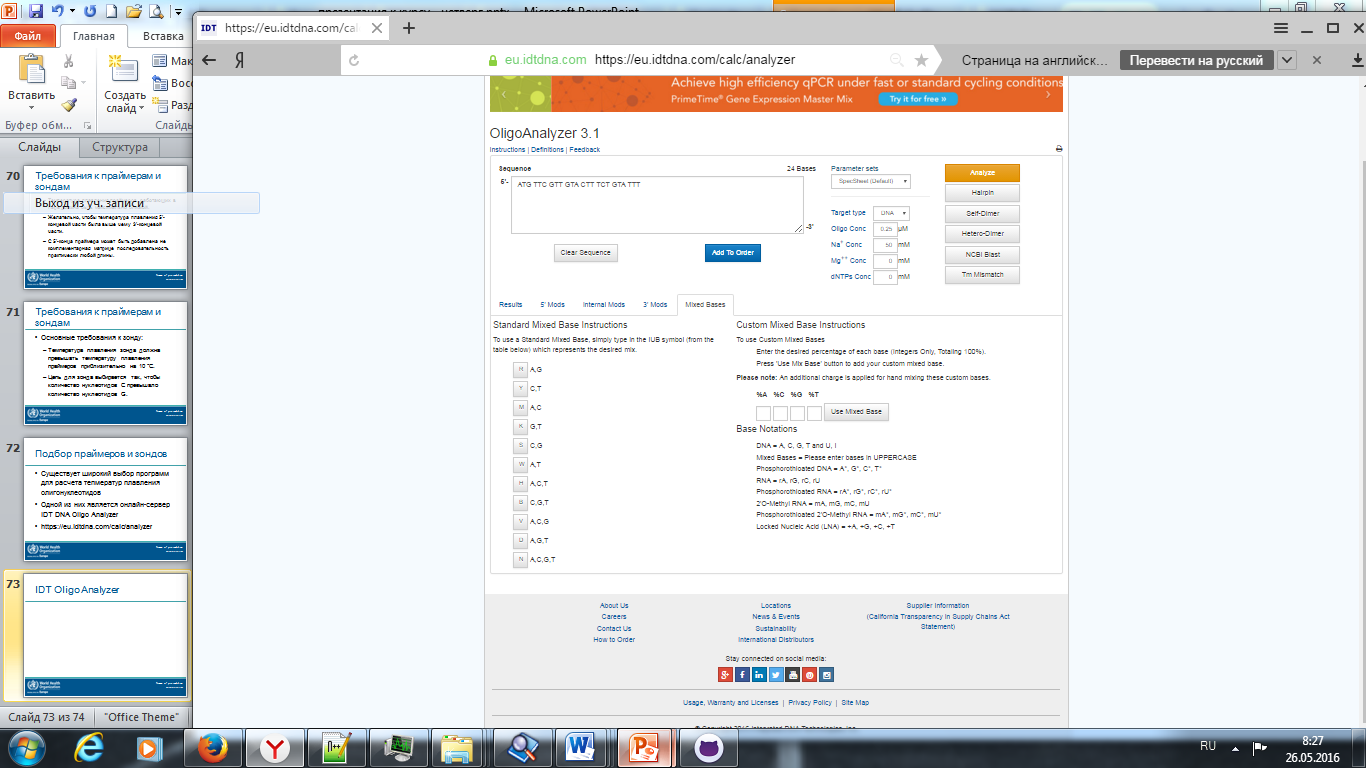


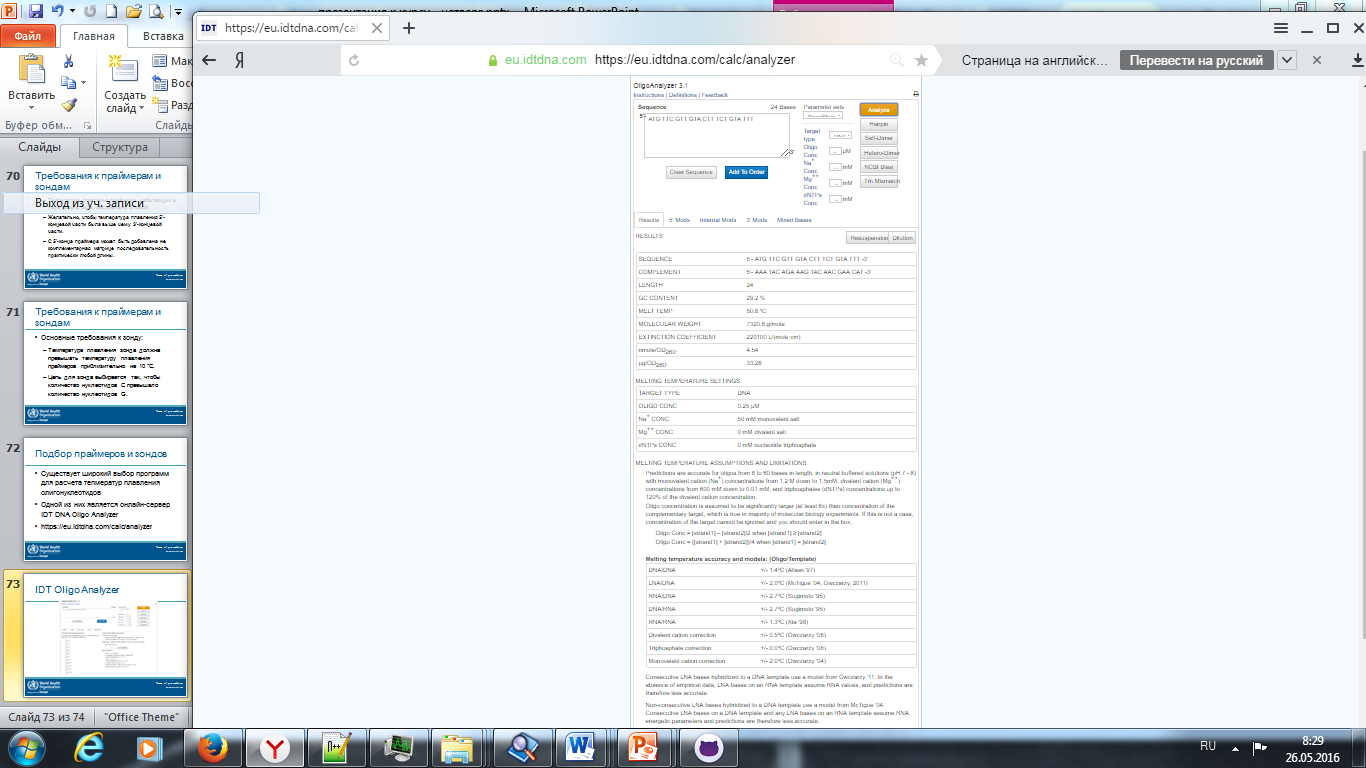
На основе очищенного выравнивания возможно составить представление о расположении консервативных участков в нуклеотидной последовательности. Выберем относительно длинный участок для посадки зонда.



Оценим термодинамические характеристики такого зонда. Для этого воспользуемся онлайн-калькулятором IDTDNA

* https://eu.idtdna.com/calc/analyzer



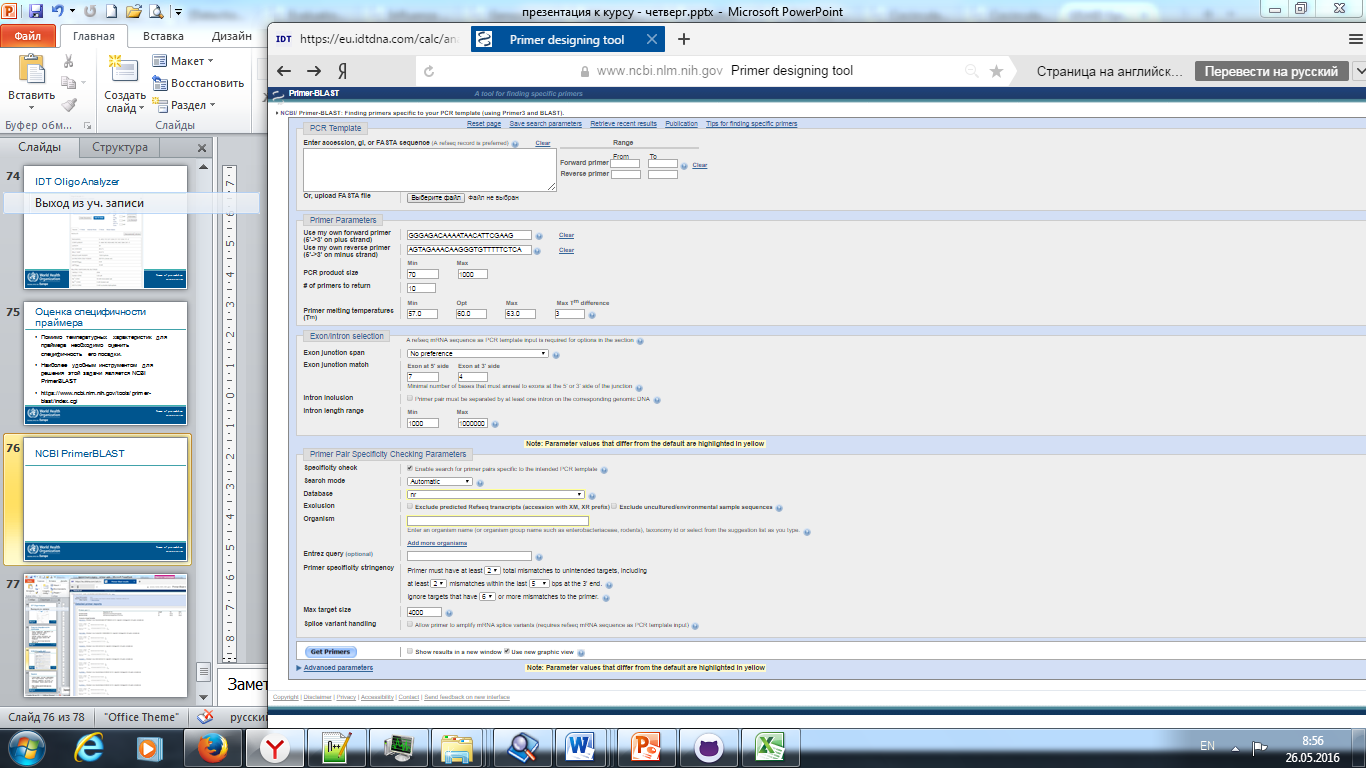


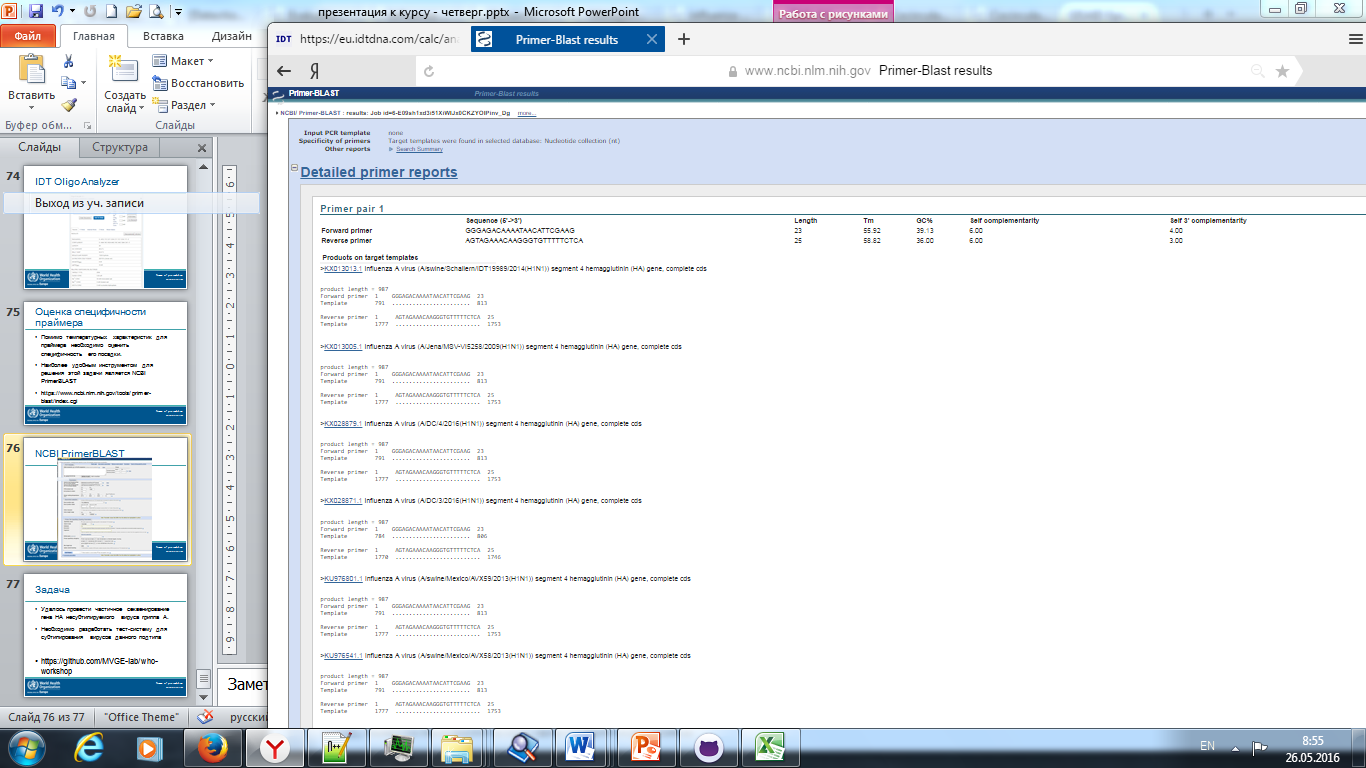
Теперь оценим специфичность нашего зонда с помощью NCBI BLAST.

Определившись с последовательностью зонда, выберем последовательности для прямого и обратного праймера и оценим их термодинамические свойства.

Для оценки специфичности полученных праймеров воспользуемся онлайн-сервером NCBI PrimerBLAST

* https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi





Теперь необходимо присоединить флуорофор и гаситель к зонду. В зондах, разработанных по технологии TaqMan, флуорофор обычно размещается на 5’-конце, а гаситель – на 3’-конце. При длине зонда более 30 нуклеотидов гаситель рекомендуется размещать внутри последовательности через модифицированный нуклеотид Т, а 3’-конец блокировать от возможного удлиннения. В качестве флуорофора и гасителя используем пару FAM – BHQ1.

Теперь необходимо создать температурный профиль реакции для новой ПЦР-тест системы.

Типовой температурный профиль реакции реал-тайм ОТ-ПЦР будет иметь следующие этапы:

* обратная транскрипция
* активация
* денатурация
* совмещенные отжиг праймеров и элонгация.

Определив условия проведения ОТ-ПЦР, нам предстоит оценить ее характеристики:

* специфичность – на панели негриппозных патогенов и вирусов гриппа других подтипов не менее чем в 3 повторах на каждый образец
* чувствительность – на наборе из 10 последовательных десятикратных разведений положительного контрольного образца не менее чем в 6 повторах на каждое разведение
* правильность результатов - на наборе из 3 разведений ПКО с различным содержанием материала в не менее чем 4 повторах и не менее чем в 4 постановках

Завершить оценку функциональных характеристик необходимо составлением отчета, который объединит в себе все полученные результаты.