

УДК 619:616-07

ОСВОЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ НА БАЗЕ ИСПЫТАТЕЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРИИ

**Силантьева Е.А., студентка 5 курса факультета ветеринарной
медицины и биотехнологии**

**Научный руководитель – Ляшенко Е.А., кандидат биологических
наук, доцент
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ**

***Ключевые слова:** ПЦР, диагностика, амплификация.*

Полимеразная цепная реакция один из самых точных методов диагностики. Она активно используется в диагностики заболеваний, а также наличие ГМО в продуктах. Цель моей работы ознакомиться с актуальным методом постановки ПЦР флуоресцентной детекцией в режиме реального времени на амплификаторе Rotor-Gene Q 6000.

В современном мире ПЦР сильно упрощает диагностику вирусных заболеваний. Данный метод диагностики широко используется в медицине и ветеринарии. ПЦР дает возможность определить патогенный микроорганизм даже в том случае, если в исследуемом материале присутствует всего несколько его молекул ДНК. Сущность ПЦР как метода молекулярной биологии заключается в многократном избирательном копировании определённого гена (участка ДНК) при помощи специальных ферментов в условиях *in vitro* [1, 2, 3, 4].

Материал и методы исследования. Исследование проводилось на базе испытательной лаборатории ОГБУ Симбирский референтный центр ветеринарии и безопасности производства. Путем выполнения полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Для выполнения реакции использовались следующие пробы: смывы с видимых слизистых оболочек (носа и ротоглотки), кровь, моча, фекалии, молоко и смывы с половых путей. Применялись наборы производства «ВЕТ-ФАКТОР», «Органик», «fractal BIO» для выявления

ДНК/РНК из биологического материала, а так же для экстракции ДНК из растительного сырья. Для получения результата полученные смеси НК и контрольные образцы загружались в амплификатор Rotor-Gene Q.

Результаты исследования. Мною было проведено 20 реакций полимеразной цепной реакции с различными производителями. Перед началом работы я ознакомилась с методикой проведения. Так как у каждого производителя отличается состав набора я рассмотрю стандартную схему постановки ПЦР. Исследование проводилось в 3 этапа: отбор проб, выделение НК, амплификация НК.

На первом этапе направленные пробы мы подготавливаем для исследования – отбираем в пробирки объемом 1 мл поступившие пробы и нумеруем в соответствии с регистрационным номером.

Второй этап заключается в экстракции НК из отобранных проб. Для начала мы переносим 100мкл/50мкл в новые пробирки и отбираем пробирку отрицательного контроля. Затем в эти пробирки мы добавляем лизирующий раствор и внутренний контрольный образец. Пробирки перемешиваем на вортексе и прогреваем 5 минут при 60°. Затем мы добавляем преципитирующий раствор и сорбент, оставляем пробирки на столе на 5 минут и после перемешивания центрифугировать 1 минуту. Затем мы удаляем образовавшуюся надосадочную жидкость и добавляем растворы для отмывки (после каждого обязательно перемешать, центрифугировать и удалить надосадочную жидкость). После последнего удаления жидкости пробирки помещаются в термостат при 60° с открытыми крышками на 5-10 минут до полного высыхания. Последним мы добавляем буфер для элюции, перемешиваем, прогреваем 5 минут при той же температуре и центрифугируем. Пробы готовы к последующей амплификации

На третьем этапе выделение заключается в работе в боксе и работе амплификатора. Для проведения данного этапа нам нужно приготовить смесь из 3х компонентов(расчет на 1 пробирку): 5 мкл ПЦР смеси + 10мкл ПЦР буфера + 0,5мкл полимеразы. Мы рассчитываем количество смеси на каждую реакцию. На этом этапе у нас прибавляются еще 2 контрольные пробирки – отрицательный контроль (К-) и положительный контроль (К+). в каждую пробирку мы вносим 15мкл реакционной смеси и 10мкл выделенной НК. Пробирки плотно закрываются после внесения НК. в пробирку К- мы вносим ДНК буфер,

а в К+ положительный контрольный образец. После распределения подготовленной НК мы помещаем пробирки в кольцо амплификатора, ставим кольцо в аппарат и запускаем программу для определения НК.

При проведении ПЦР нужно соблюдать меры безопасности и поддерживать чистоту бокса. До начала работы и после ее окончания все поверхности протираются 70% спиртом. После работы в боксах включают УФ лампу на 1 час. Так же в конце рабочего дня все боксы промываются дезинфицирующим раствором «Клорсепт» 0,015%. Для обеспечения личной безопасности используется одноразовая спецодежда (чепчик, халат) поверх многоразовой, а также маски и перчатки. Одноразовая одежда меняется на каждом этапе проведения. Каждый этап проводится в отдельном помещении.

Все приходящие пробы регистрируются в специальном журнале и выписываются сразу после готовности результатов. Так же все пробы регистрируются в системе «Веста».

Библиографический список:

1. Новейшие технологии в генодиагностике: полимеразная цепная реакция в реальном времени (Real-Time PCR) / А. Н. Екимов [и др.] // Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Министерства Здравоохранения Российской Федерации. 2008.

2. Пульчеровская Л.П. Изыскание альтернативных средств и методов для диагностики заболеваний, вызываемых бактериями рода *Citrobacter* / Л.П.Пульчеровская, С.Н. Золотухин, Д.А.Васильев// Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.- 2004. -№ 12.- С. 53-57.

3. Бактериофаги зооантропонозных и фитопатогенных бактерий / Д.А. Васильев и др. // Ульяновск, 2017. – 176 с.

4. Выделение, диагностика и идентификация бактерий рода *Klebsiella* / Е.А. Бульканова // в сборнике: Региональные проблемы народного хозяйства. Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых. – Ульяновск. - 2004. - С. 257-262.

MASTERING THE POLYMERASE CHAIN REACTION ON THE BASIS OF A TESTING LABORATORY

Silanteva E.A.

Keywords: *PCR, diagnosis, amplification*

The polymerase chain reaction is one of the most accurate diagnostic methods. It is actively used in the diagnosis of diseases as well as the presence of GMOs in products. The aim of my work is to introduce the current method of real-time PCR with fluorescent detection on a Rotor-Gene Q 6000 amplifier.