

может выживать в том или ином субстрате, но и от того, как успешно он может выживать при перемещении из одного субстрата в другой, третий и т.д.

Литература.

1. Куприянов А.А. 2009. Динамика выживания бактерий в цепи взаимосвязанных природных субстратов. Автореф. дисс. на соиск. уч. степ. к.б.н. М. «СТ-ПРИНТ» 24 с.
2. Одум Ю. 1986. Экология. Том 2. М. Мир. 376 с.
3. Семёнов А.М. 2005. Трофическое группирование и динамика развития микробных сообществ в почве и ризосфере. Дис. на соиск. уч. степ. д.б.н. в виде научн. доклада. М. 2005. «МАКС Пресс». 66 с.
4. Черкасский Б.Л. 1994. Инфекционные и паразитарные болезни человека. М. Изд. Мед. Газета. 617 с.
5. Semenov A.M., Kuprianov A.A., Van Bruggen A.H.C. 2010. Transfer of enteric pathogens to successive habitats as part of microbial cycles. *Microb. Ecol.* 60:239-249.

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ К ТЕСТ-СИСТЕМЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВИРУСА МИКСОМЫ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Синдрякова И.П., аспирант, Моргунов С.Ю., аспирант, Сальников Н.И аспирант, Колбасов Д.В., доктор ветеринарных наук, профессор

ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

Тел./факс: (49243) 6-21-25;

6-10-56 VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru

Ключевые слова: вирус миксомы, нуклеиновые кислоты, ПЦР, рекомбинантная плаزمид.

Статья посвящена получению рекомбинантного положительного контроля к ПЦР тест-системе для обнаружения ДНК вируса миксомы.

Введение.

Миксоматоз — остро протекающая, высококонтагиозная болезнь кроликов, характеризующаяся воспалением слизистых оболочек и появлением студенистых отеков в области головы, ануса, гениталий и кожи [1]. В России эпизоотические вспышки миксоматоза регистрируются в кролиководческих хозяйствах, начиная с 1978 г.

Возбудитель миксоматоза – *Muxomatosis cuniculorum* – ДНК-содержащий вирус, относящийся к роду *Leporipoxvirus* семейства *Poxviridae*. Вирус миксомы имеет большой 2-х цепочечный ДНК-геном длиной 163 тысячи пар оснований, который реплицируется в цитоплазме инфицированных клеток. Миксоматозом болеют кролики независимо от возраста. Распространение болезни в естественных условиях происходит через кровососущих насекомых — комаров, кроличьих блох, вшей и клещей, в организме которых вирус сохраняется до 7 месяцев, создавая резервуар возбудителя в природе [2].

Лабораторные диагностические исследования на наличие вируса миксомы проводят путем гистологического изучения инфильтратов, постановки биопробы на кроликах. Для обнаружения у кроликов антител к возбудителю применяют серологические методы, такие как: РИФ, РСК, РДП, РН, ИФА [1]. В ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии была разработана «Тест-система для выявления ДНК виру-

са миксомы методом полимеразной цепной реакции” (далее “Тест – система...”), в которой в качестве положительного контроля (ПК ПЦР) использовалась ДНК вируса миксомы. Однако применение данного положительного контроля имеет ряд недостатков: небольшой срок хранения, необходимость работы с вирусной ДНК, низкая концентрация.

В настоящее время в диагностических тест-системах в качестве положительного контроля применяется рекомбинантная плазида, характеризующаяся специфичностью, безопасностью приготовления и использования, низкой себестоимостью, длительным сроком хранения.

В связи с этим целью нашей работы являлось создание положительного контроля основе рекомбинантной плазмиды к диагностической тест-системе для выявления вируса миксомы методом полимеразной цепной реакции.

Материалы и методы исследований.

С использованием компонентов набора «Тест система...» амплифицировали фрагмент (550 п.о.) гена M022L вируса миксомы, штамм MP. Постановку реакции осуществляли на термоциклере Palm Cycler (Corbett Research, Австралия). Полученный фрагмент встраивали в плазмидный вектор pGEM –T Easy (Promega, США) в соответствии с инструкцией изготовителя. Методом электропорации трансформировали рекомбинантной плазмидой компетентные клетки E. coli, штамм Top 10 (Invitrogen, США). Трансформированные клетки высевали на агар, содержащий ампициллин (100 мкг/мл), X-Gal (0,5 мМ) и IPTG (80 мкг/мл). После 8-10 ч инкубации при температуре 37°C проводили первичный скрининг клонов по цвету колоний (колонии белого цвета содержат рекомбинантную плазмиду, синего цвета – не содержат). Отобранные колонии высевали в среду SOB и инкубировали при перемешивании до достижения средней логарифмической фазы. Методом щелочного лизиса из 1,5 -2 мл бактериальной культуры каждого клона выделяли плазмидную ДНК, которую затем проверяли методом ПЦР на наличие фрагмента генома вируса миксомы.[4]

Подбор оптимальной концентрации плазмиды в качестве матрицы для постановки ПЦР, и определение чувствительности реакции проводили, с использованием серии десятикратных разведений.

Результаты исследований.

В результате скрининга клеточных культур несущих фрагмент гена M022L вируса миксомы, было отобрано 10 клонов. С целью проверки встройки участка генома вируса миксомы в вектор pGEM –T Easy была проведена ПЦР с компонентами набора “Тест – система...”. Специфический фрагмент выявляли на уровне 550 п. о., что соответствует искомому размеру ПЦР - продукта (Рис. 1).

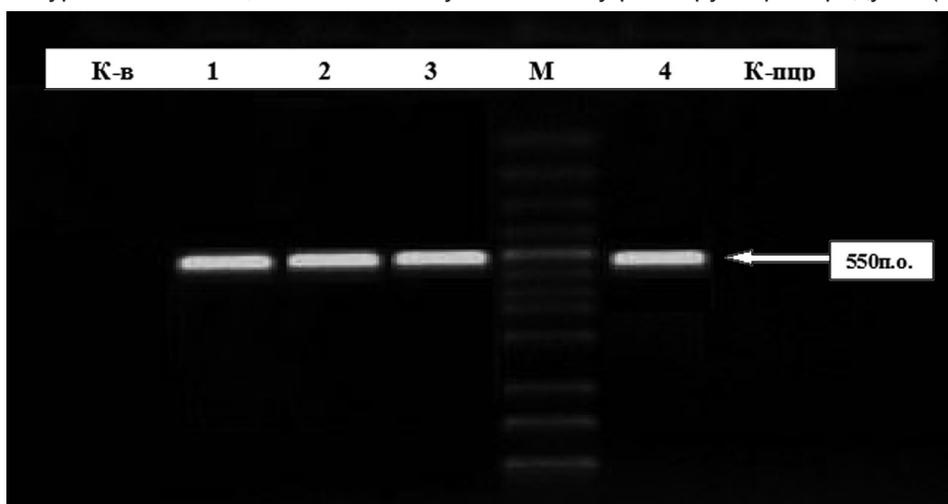


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ПЦР.

Треки: К-в- отрицательный контроль выделения; 1-органный вирусосодержащий материал от кроликов, зараженных штаммом MP вируса миксомы; 2- культуральный материал (ФЭК), содер-

жащий штамм В-82 вируса миксомы; 3- лиофилизированный материал, содержащий штамм МР вируса миксомы; М - маркер молекулярной массы Gene Ruler 3000 bp DNA Ladder Plus (Fermentas); 4- рекомбинантная плаزمида; К-пцр- отрицательный контроль ПЦР.

Затем было проведено сравнение стабильности геномного и плазмидного контролей в условиях использования набора. Для этого проводили их 10кратное замораживание/оттаивание при применении компонентов «Тест – системы....». В результате электрофореза наблюдали сильное деградирование молекул ДНК вируса миксомы. Плазмида, напротив, выдерживала многократное замораживание/оттаивание, что также является одним из преимуществ ее использования в наборах в качестве положительного контроля ПЦР.

В ходе определения оптимальной концентрации плазмиды было установлено, что при использовании в качестве матрицы геномной ДНК вируса миксомы (штамм МР, инфекционная активность 5,0 lg LD 50/см³) искомым амплифицированный фрагмент выявляли в разведении 1:10⁴(1,0 lg LD 50/см³), а с использованием рекомбинантной плазмиды(исходная концентрация 3*10¹⁰ копий молекул ДНК на мкл) - в разведении 1:10⁸ (300 копий молекул ДНК на мкл) (рис.2). Таким образом, для использования в «Тест- системе ...» необходимо применять плазмиду в разведении 1:10⁴ или 1:10⁵.

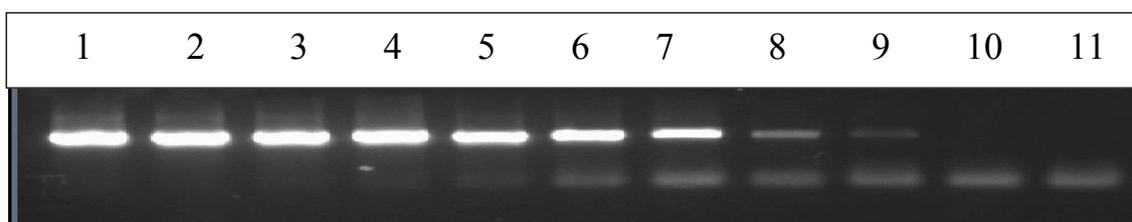


Рис.2. Электрофореграмма результатов ПЦР с использованием в качестве матрицы разведений плазмиды.

Треки : 1- исходная плазмида, 2- 11 – рекомбинантная плазмидная ДНК в разведениях с 1: 10¹ до 1: 10¹⁰ соответственно.

Заключение.

В ходе исследований была оценена специфичность связывания праймеров, входящих в диагностический набор, с нуклеотидной последовательностью рекомбинантной плазмиды. При детекции продуктов амплификации с помощью электрофореза фрагмент расчетного размера обнаруживали в пробах материала, содержащих вирус миксомы, и в пробе, содержащей плазмидный положительный контроль. Таким образом, диагностические праймеры комплементарны соответствующим участкам созданной плазмиды, что позволяет использовать ее в качестве положительного контроля в разработанной тест-системе для выявления ДНК вируса миксомы методом полимеразной цепной реакции.

Библиографический список:

- 1.Сюрин В.Н. «Вирусные болезни животных», ВНИТИБП, Москва, 1998. – 742-746 с.
2. Nash, P., Barrett, J., Cao, J. X., Hota-Mitchell, S., Lalani, A. S., Everett, H., Xu, X. M., Robichaud, J., Hnatiuk, S., Ainslie, C., Seet, B. T. &McFadden, G. (1999). Immunomodulation by viruses : the myxomavirus story. Immunological Reviews 168 , 103-120.
3. Molecular Cloning. A laboratory Manual / T.Maniatis, E.F. Fritsch, S. Sambrooks // Cold Spring Harbor Laboratory. - Cold Spring Harbor, New York, 2006.
4. Molecular Cloning. A laboratory Manual/J.Sambrook, D.W.Russell// Cold Spring Harbor Laboratory. - Cold Spring Harbor, New York, 2001. P.132-134.
5. Positive control development for diagnosis of myxoma virus DNA by PCR kit.
6. The current article covers the research in method of recombinant positive control for myxoma virus detection by PCR elaboration.