

IDENTIFICATION OF CONTAMINANTS OF CELL CULTURES OVINE ORIGIN BY PCR

Hayrapetyan Sh.A., Baryshnikov E.I.

Key words: cell culture (SMYA) Identification of Mycoplasma PCR electrophoretic detection to identify genome (LMZ).

Cell culture and widespread application in various fields of Experimental Biology and Medicine to study and solve the fundamental problems of public and private virology, oncology, biochemistry, biotechnology, etc. The problem of identification of cells in culture has become apparent in the 50-60s of the twentieth century, when the analysis of chromosome sets of species-specific antigens and a number of human cell lines and animals were cases of interspecies cell contamination.

УДК 619:616-07

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОМА РАБДОВИРУСОВ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

Курбанова К.М., 5 курс факультета ветеринарной медицины

Научный руководитель: к.б.н., с.н.с. Калабекова Ф.С.

ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

Ключевые слова: ПЦР, идентификация, рабдовирусы, лососевые рыбы.

В статье представлены исследования по молекулярно-генетическим методам для идентификации генома рабдовирусов лососевых рыб.

По оценкам ФАО, аквакультура является самым быстрорастущим сектором сферы производства продуктов питания в мире.

Серьезным препятствием на пути успешного развития аквакультуры являются болезни объектов культивирования, из которых основной ущерб наносят вирусные болезни рыб [Ahne W, 1977].

В целом эпизоотическая обстановка по вирусным болезням рыб в РФ неблагоприятная. Это обусловлено наличием у культивируемых в стране рыб опасных вирусных инфекций, среди которых две относятся к МЭБ-декларируемым, неопределенностью эпизоотического статуса по вирусным инфекциям практически всех рыбоводных хозяйств и отсутствием реального ветеринарного контроля межхозяйственных перевозок, экспорта и импорта рыбы и оплодотворенной икры.

В 2000 г., на рыбоводных предприятиях России были зарегистрированы две экзотических вирусных инфекции – инфекционный некроз гемопоэтической ткани лососевых рыб (ИНГТ) и инфекционный некроз поджелудочной железы (ИНПЖ), из которых первая является МЭБ-декларируемой, а вторая находится в списке III Евросоюза [МЭБ]. Оба инцидента (первый – в Московской области, второй – в Мурманской области)

были связаны с завозом оплодотворенной икры или рыбопосадочного материала (в первом случае - внутри страны, во втором - из Норвегии. С 2001 г. вирус ИНГТ регулярно обнаруживают у тихоокеанских лососевых (нерка), заходящих на нерест в реки Камчатки. При этом, вспышки заболевания были зарегистрированы как на лососевых рыбоводных заводах, так и у диких рыб.

В целях недопущения возникновения и распространения возможных вирусных инфекций у выращиваемых рыб необходимо проведение мониторинговых исследований рыбоводных хозяйств и своевременная постановка диагноза. Это достигается только благодаря использованию методов, основанных на полимеразной цепной реакции, которая является главным инструментом активно развивающейся сегодня молекулярной эпизоотологии вирусных инфекций рыб.

Целью данной статьи является определение возможности заражения неконсервированной икры вирусом инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб. Определение заражения проводилось методом полимеразной цепной реакции.

Выделение и очистка нуклеиновых кислот

Выделение РНК из культурального вирусосодержащего материала проводили двумя методами:

К 100 мкл вирусосодержащего, исследуемого материала приливали 500 мкл лизирующего раствора №1. Инкубировали в течение 5 минут, при $t\ 56^{\circ}\text{C}$. После чего добавляли 30 мкл сорбента, тщательно перемешивали, осаждали сорбент центрифугированием в течение 30 секунд при 6 тыс. обр/мин. Отбирали надосадочную жидкость, к осадку добавили 500 мкл отмывочного раствора №2. Суспендировали и инкубировали пробы при $t\ 56^{\circ}\text{C}$ в течение 5 минут.

Сорбент осаждали центрифугированием в течение 30 секунд. Отбирали надосадочную жидкость и приливали к оставшемуся осадку 600 мкл 70% спирта. Перемешивали и центрифугировали 15 секунд. Отбирали надосадочную жидкость. Осадок подсушивали при комнатной температуре в пробирках с открытой крышкой в течение 10 минут. Еще раз перемешали и центрифугировали при 13,4 тысячах обр/мин 60 секунд. После чего отобрали надосадочную жидкость и использовали для проведения ОТ-ПЦР.

Постановка ОТ-ПЦР

Для проведения ОТ-ПЦР использовали термоциклеры «Терцик МС-2» (ДНК Технология, Москва) или PalmCycler (CorbettResearch, Австралия) и пробирки емкостью $0,5\text{ см}^3$ и $0,2\text{ см}^3$.

ОТ-ПЦР для выявления РНК вируса ИНГТ проводили с предварительной денатурацией со специфическими праймерами при температуре 80°C в течение 8 минут, на поверхность водной фазы наносили 30 мкл (3 капли) минерального масла, под масло вносили очищенную РНК в объеме 6 мкл. Обратную транскрипцию проводили в течение 30 минут при температуре 45°C и 3 минуты при температуре 80°C с использованием следующих компонентов: смесь праймеров (10 pmol каждого) – $2\text{ }\mu\text{l}$; 5 X буфер для обратной транскрипции – $5\text{ }\mu\text{l}$; MMVL Revertase – 1 ед; деионизированная вода – до $25\text{ }\mu\text{l}$.

Для последующей амплификации готовили следующую смесь: смесь праймеров (10 pmol каждого) – 2 µl; dNTP (25 mmol) – 0,5 µl; MgCl₂ (25 mmol) – 0,5 µl; 5 X буфер для ПЦР (AmpliSens Blue) – 5 µl; ДНК – полимеразы (TaqPol) – 1ед; кДНК (исследуемая проба) – 5 µl; деионизированная вода – до 25 µl.

Встряхивали пробы на смесителе и осаждали капли со стенок центрифугированием в течение 2 минут.

Переносили образцы в амплификатор и проводили ПЦР при следующих режимах:

- 95°C – 3 минуты
- 95°C – 12 секунд; 59°C – 18 секунд; 72°C – 30 секунд } 35 циклов.

В каждой серии анализов использовали контрольные образцы:

- ПК (культуральный вирус);
- ОК (деионизированная вода).

Смеси для контролей готовили также как и для исследуемых образцов.

Анализ продуктов ПЦР

Анализ продуктов реакции осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле (1 – 2 %) с бромистым этидием (0,001%), при силе тока 60 мА и напряжении 180 В.

Результаты реакции оценивали обнаружением специфических полос в треках с исследуемыми пробами относительно полосы в пробе с ПК. Размеры исследуемых фрагментов кДНК определяли с помощью маркера молекулярного веса. Электрофорез проводили в течение 30 – 40 минут, результаты электрофореза учитывали на трансиллюминаторе в УФ свете с длиной волны 254 нм. Результаты регистрировали при помощи геля – документирующей системы BioRad.

Результаты исследований

Проведена сравнительная оценка на основе ОТ-ПЦР двумя методами выделения нуклеиновых кислот: выделение РНК проводили или по модифицированной методике Boom et al. (1990) с применением силики, либо набором для выделения нуклеиновых кислот «Рибо-преп» («Интерлабсервис», г. Москва) и на спинколонках. Очищенную РНК сразу использовали для постановки ОТ-ПЦР.

Результаты исследований показали, применение спинколонок даёт хорошие результаты, но метод довольно длительный и дорогостоящий.

Выделение РНК на основе сорбентов является достаточно эффективным, удобным и безопасным методом и позволяет проводить процедуру выделения в короткие сроки. Результаты сравнительного анализа различных методов выделения РНК представлены на электрофореграмме (рис 1).

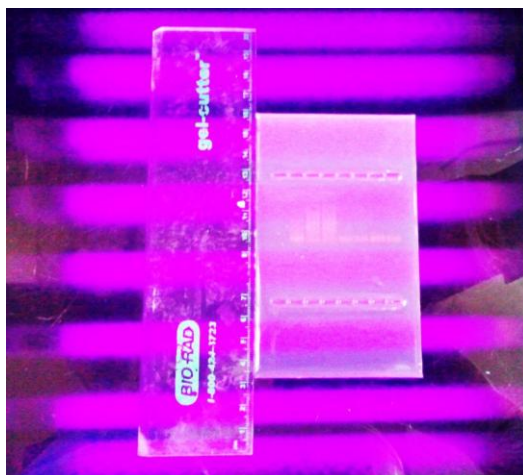


Рис. 1 Результаты электрофореграммы

В результате проведенных исследований установлено, что выделение и очистка РНК с помощью сорбента является наиболее эффективным, безопасным, экспрессивным методом и имеет низкую себестоимость.

Заключение

Данная работа позволила нам определить возможность идентификации вируса ИНГТ с помощью ПЦР. С этой целью нами был отработан метод выделения РНК, подобраны специфические праймеры и оптимизированы условия постановки ОТ – ПЦР.

В ходе проведенной работы мы определили возможность выявления РНК из зараженной икры методом ПЦР с электрофоретической системой детекции продуктов амплификации с использованием праймеров, рассчитанных на участок L гена РНК вируса ИНГТ.

MOLECULAR GENETIC METHODS TO IDENTIFY GENOME RHABDOVIRIDAE SALMONIDS

Kurbanova K.M., Kalabekova F.S.

Keywords: PCR identification rhabdoviridae, salmon.

The article presents a study on molecular genetic metodamlyidentifikatsii genome rhabdoviridae salmonids.