

УДК 619:616.98:578.824.11:577.21

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОСТАНОВКИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНОМА ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ

Андропова А.С., студент 4 курса факультета ветеринарной медицины

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Научный руководитель - Бурдинская О.Н., кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаб. Генодиагностики вирусных болезней животных

ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

Ключевые слова: вирус болезни Ауески (ВБА), полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ), оптимизация.

Аннотация. Работа посвящена подбору оптимальных условий постановки ПЦР-РВ для выявления фрагмента генома ВБА в культуральном материале. При проведении исследований авторами подобраны условия постановки реакции по температурно-временному режиму и по количественному составу ПЦР-смеси;

Болезнь Ауески (БА) представляет серьезную угрозу свиноводству и другим отраслям животноводства развитых стран. У переболевших свиней БА переходит в латентную форму, при которой вирус может пожизненно персистировать в организме животных, кроме того резервуаром инфекции остаются дикие кабаны. [1]. В связи с этим болезнь продолжает оставаться одной из серьезных проблем во многих странах мира, поэтому своевременное и быстрое установление болезни в хозяйствах является залогом предотвращения значительного экономического ущерба. [2]. В этой связи применение такого быстрого метода лабораторной диагностики как полимеразная цепная реакция в комплексе диагностических мероприятий при БА является актуальным.

В работе использовали культуральный материал, содержащий вирус болезни Ауески (штамм «МК-25», $6,5 \lg \text{TCID}_{50/\text{мл}}$), выращенный на перевиваемой культуре клеток ПСГК.

Вирусную ДНК из исследуемого материала выделяли с использованием гуанидинтиоционатного лизирующего буфера с последующим применением нуклеосорбента по методике, предложенной Boom et al. (1990 г.) [3] в нашей модификации. Постановку ПЦР-РВ проводили на детектирующем термоциклере «Rotor Gene Q» (QIAGEN, Германия).

Подбор оптимальных условий проведения ПЦР-РВ, таких как температура отжига праймеров, количественный состав ПЦР-смеси, проводили с использованием последовательных десятикратных разведений вирусосодержащего материала.

В результате проведённых исследований был определён оптимальный состав ПЦР смеси объёмом 25 мкл: 2,5 мкл 10-кратного ПЦР буфера, 2 мкл 25 мМ $MgCl_2$, по 1 мкл каждого праймера (с концентрацией 10 пмоль), 0,6 мкл смеси трифосфатов (с исходной концентрацией 10 мМоль), 0,25 ед. Taq полимеразы, 5 мкл раствора исследуемой ДНК.

При оптимизации температуры отжига праймеров выявлено, что оптимальной является температура 67°C.

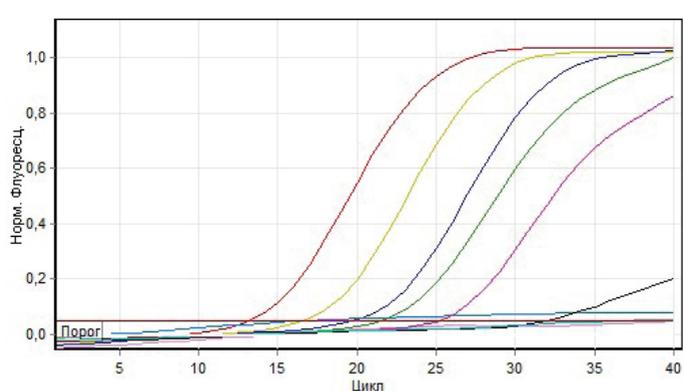


Рисунок 1 - Результаты ПЦР-РВ для выявления генома ВБА в культуральном материале

Примечания: разведения ДНК: 1- 10^{-1} ; 2- 10^{-2} ; 3- $1 \cdot 10^{-3}$; 4- $1 \cdot 10^{-4}$; 5- $1 \cdot 10^{-5}$; 6- $1 \cdot 10^{-6}$.

Данные условия реакции (состав реакционной смеси, температурные режимы реакции) обеспечивали оптимальный уровень детекции флуоресцентного сигнала и построение характерной кривой флуоресценции с четко выраженными стадиями элонгации, экспоненциального роста и выходом на плато (Рис. 1).

Библиографический список:

1. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина-М., 1998. – 928с.
2. Kovanagh, N.T. Epidemiological studies of Aueszkys disease for the purpose of eradication [Серозэпизоотологические исследования болезни Ауески в стадах

свиней и проблемы искоренения болезни (Великобритания)] / N.T. Kovanagh // Pig Journal.-1995.-Vol.35.-P.83-93.

3. Boom, R. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R. Boom [et al.] // J. of Cl. Microbiology.-1990.-vol.28, № 33.-P.-495-503.

OPTIMIZATION OF CONDITION FOR POLYMERASE CHAIN REACTION IN REAL TIME FOR DETECTION OF AUJESZKY'S DISEASE VIRUS GENOMIC SEQUENCES

Andronova A.S., Burdinskaya O.N.

Key words: Aujeszky's disease virus (ADV), polymerase chain reaction in real-time (RT-PCR), optimization.

Summary. The work is devoted to the optimization of the optimal conditions for PCR-RT for detection of Aujeszkys disease virus genomic sequences in the cell culture material. In the study the authors selected conditions posing reaction temperature and time mode and quantitative composition of the PCR-RT mixture.

УДК 636.4.087.7

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СОВРЕМЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЮЩИХСЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ МАЛАССЕЗИОННОГО ОТИТА У СОБАК

Бадова Н.Д., студентка 5 курса факультета ветеринарной медицины
Научные руководители - Бурцева Т.В., кандидат ветеринарных наук,
доцент; *Бадова О.В.*, кандидат ветеринарных наук, доцент

ФБГОУ ВПО «Уральский ГАУ», г. Екатеринбург

Ключевые слова: собака, отит, Малассезия

Аннотация. В настоящее время у собак часто встречаются хронические отиты, трудно поддающиеся лечению. У вислоухих пород этому способствует отсутствие достаточной аэрации кожи слухового прохода, и создаются благоприятные условия для развития патогенной микрофлоры.