

УДК 574

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ В ПЦР

*Пуклакова А.В., студентка 4 курса ФВМиБ, Puklakova97@yandex.ru
Научный руководитель – Сальников Н.И., кандидат биологических наук
ФГБНУ ФИЦФим*

Ключевые слова: ПЦР, геном, вирус оспы овец, электрофорез, штамм.

Работа посвящена изучению болезни оспы овец и разработке методики выявления его генома при помощи ПЦР, на примере штаммов P32 и EEV.

Введение. Оспа овец наносит овцеводству огромный экономический ущерб, слагающийся из гибели и вынужденного убоя больных животных, снижения продуктивности, затрат на проведение ветеринарно-санитарных и охранно-карантинных мероприятий [2].

Вирус оспы овец (ВОО) вызывает ряд типичных изменений в коже: гиперплазию эпителия и пролиферацию клеток эндотелия, выстилающего капилляры, формирование микрососудов эпидермы, образование элементарных телец, возникновение цитоплазматических включений на месте размножения [3]. У некоторых животных в легких появляются множественные группы слившихся клеток. При микроскопии ткань пораженного легкого характеризуется гиперемией, гепатизацией и появлением экссудата, коагулятивным некрозом, окруженным зоной воспалительной реакции, утолщением межлобулярной мембраны [4,].

Источником инфекции являются больные животные, особенно в период генерализации процесса. Вирус передается при контакте больных животных со здоровыми, а от овец, с поражениями трахеи и легких, - воздушно-капельным путем. Не исключен алиментарный путь заражения при попадании вируса на слизистую оболочку рта [2].

Карантин является одним из профилактических мер по отношению к распространению оспы овец. Обычно профилактические мероприятия начинаются с применения вакцины от оспы овец ко всему имеющемуся поголовью.

Целью данной работы являлось изучение и разработка методики выявления генома вируса оспы овец в ПЦР, на примере штаммов P32 и EEV, выделенных в Калмыкии и Ярославской области.

Задачи. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Рассмотреть методику выявления генома вируса оспы овец;
2. Постановка полимеразной цепной реакции.

Ход работы. В ходе исследования были задействованы два штамма вируса оспы овец из Республики Калмыкия и Ярославской области. Для амплификации ДНК использовали реакционную смесь объёмом 20 мкл, состоящую:

Для штамма P32:		Для штамма EEV:	
Компонент	Концентрация	Компонент	Концентрация
P32 F	1 мкл	EEV F	1 мкл
P32 R	1 мкл	EEV R	1 мкл
Буфер	5 мкл	Буфер	5 мкл
dNTP	0,5 мкл	dNTP	0,5 мкл
Taq - Полимераза	0,5 мкл	Taq - Полимераза	0,5 мкл
Вода	12 мкл	Вода	12 мкл
ДНК-матрица	5 мкл	ДНК-матрица	5 мкл

Амплификацию специфического участка проводили на детектирующем амплификаторе «DTprime» фирмы «ДНК-Технология», включающие несколько циклов амплификации, при следующих режимах:

Для штамма P32:			Для штамма EEV:		
Денатурация	94 °С	5 мин	Денатурация	95 °С	2 мин
38 циклов:			35 циклов:		
Денатурация	94 °С	30 сек	Денатурация	95 °С	30 сек
Отжиг	50 °С	30 сек	Отжиг	50 °С	30 сек
Элонгация	72 °С	30 сек	Элонгация	72 °С	40 сек
Далее:			Далее:		
Достройка цепей	72 °С	5 мин	Достройка цепей	72 °С	5 мин

По завершении наработки ДНК, полученные пробы анализировали в электрофорезе в 1,5% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Результаты (рис. 1, рис. 2) показали, что продуктом амплификации является участок ДНК генома вируса оспы овец длиной 390 (P32) и 750 (EEV) пар оснований в виде наиболее ярких и чётких полос.

Заключение. Таким образом, проведённые исследования показали нам, что данный метод выявления является пригодным по отношению

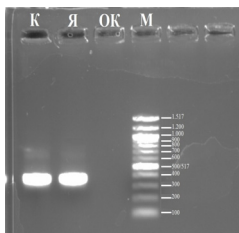


Рисунок 1 - Электрофореграмма амплифицированной ДНК вируса оспы овец (Штамм P32). (К - Калмыкия, Я - Ярославская область, ОК – отрицательный контроль, М – маркер ДНК, продукт – 390 п.о.)

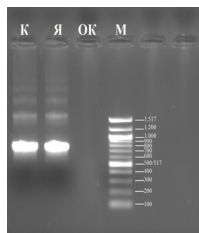


Рисунок 2 - Электрофореграмма амплифицированной ДНК вируса оспы овец (Штамм EEV). (К - Калмыкия, Я - Ярославская область, ОК – отрицательный контроль, М – маркер ДНК, продукт – 750 п.о.)

к геному вируса оспы овец. Из результатов исследований видно, что с помощью метода ПЦР удалось выявить специфический фрагмент ДНК оспы овец. Как и следовало ожидать данный специфический фрагмент не был выявлен в отрицательных контролях. Определение первичной последовательности показало наличие последовательности, характерной для оспы овец. Дифференциация инфекции, вызванной ВОО, методом ПЦР в настоящее время является самым специфичным методом исследования.

Библиографический список

1. Зорина В.В. Методическое пособие. Основы полимеразной цепной реакции / В.В. Зорина к.б.н. ведущий специалист ООО «ДНК-Технология», Москва 2012 г. 76 с.
2. Сюрин В.Н. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я., Самуйленко, Б.В.? Соловьев, Н.В. Фомина.-М.: ВНИТИБП, 1998. - 928 с.
3. Сюрин В.Н. и др. Диагностика вирусных болезней животных. / В.Н. Сюрин/ М. Агропромиздат, 1991. -524 с.
4. Buller, R.M.L. Poxvirus pathogenesis / R.M.L. Buller, G.J. Palumbo // Microbiol. Reviews. - 1991. - Vol. 55. - P. 80-122.

DEVELOPMENT OF METHODS OF IDENTIFYING THE GENOME OF THE VIRUS OF SHEEP POX IN PCR

Puklakova A.V., Salnikov N.I.

Key words: *PCR, genome, sheep pox virus, electrophoresis, strain.*

The work is devoted to the study of smallpox disease of sheep and the development of methods for identifying its genome using PCR, on the example of P32 and EEV strains.