

мый признак, который может быть улучшен методом селекции. Отбор и селекцию крупного рогатого скота по признакам питания необходимо проводить в направлении роста продолжительности и эффективности образцов пищевого поведения.

С учетом положительного влияния пищевой активности на продуктивные качества и снижения величины надоя при развитии групповых взаимодействий, селекция должна быть направлена в пользу активизации приема

корма и жвачки и снижения количества столкновений в стаде.

При смене одного поколения продолжительность приема корма может быть увеличена на 37 мин и жвачки на 38 мин, а число групповых взаимодействий снижено на 6,5 раз в сутки, в т.ч. столкновений на 15,5 раза.

Улучшение наследственности, а также условий онтогенеза и создание адаптивной среды обитания являются основными факторами формирования позитивного поведения.

Литература:

1. Ковальчик К. Частная этология дойных коров. – М.: Колос, 1978.
2. Павлов И. П. Полное собрание сочинений. Т. 3 – 4. – АН СССР, 1951.
3. Попов И. С. Избранные труды. – М.: Колос, 1966.

УДК 619:579

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО УЧАСТКА ДНК ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Н.И. Молофеева, А.С. Разорвина
Научно-исследовательский инновационный центр
микробиологии и биотехнологии

ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

Целью настоящей работы была разработка специфических праймеров к ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale*, создание и апробация ПЦР-протокола.

Материалы и методы.

Для анализа нуклеотидного состава ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale* были использованы базы данных GeneBank и Afsa. Для поиска уникальных последовательностей специфического гена были использованы ресурсы GeneBank – on-line Blast.

Для подбора праймеров были использованы программы Gene Runner Version 3.05 и Primer Blast (ресурсы GeneBank).

Для проведения амплификации был использован детектирующий термоциклер «ДТ-322» производства ООО «ДНК-Технология», г.Москва, позволяющий проводить амплификацию и флуоресцентную детекцию в режиме «реального времени».

После синтеза олигонуклеотидов были подобраны оптимальные условия проведения полимеразной цепной реакции (концентрация

праймеров, температурные параметры и количество циклов амплификации). Для проведения амплификации использована коммерческая стандартизированная реакционная смесь для проведения ПЦР в режиме «реального времени» с Taq-ДНК-полимеразой и ингибирующими ее активность антителами в присутствии красителя SYBR Green I производства «Компании «Синтол» (г.Москва). Для выделения ДНК применялись реактивы «Проба ГС» производства ООО «ДНК-Технология»(г.Москва). Для проведения электрофоретической детекции продуктов амплификации были использованы коммерческие наборы производства ООО «ДНК-Технология» (г.Москва), содержащие готовые 2,3% агарозные гели с сухой навеской буферной смеси.

Для апробации предложенной методики были использованы полевые штаммы *Ornithobacterium rhinotracheale* НИИЦМБ Ульяновской УГСХА и культура *Ornithobacterium rhinotracheale* (штамм № 51463, 51464).

Результаты исследований.

Для дизайна праймеров нами было решено использовать 16s рибосомальный ген *Ornithobacterium rhinotracheale*.

В базе данных GeneBank была найдена полная нуклеотидная последовательность гена 16sRNA. Затем она была просканирована системой Blast этой базы данных на предмет совпадения с существующими данными секвенирования других микроорганизмов. 100% совпадения более не встречалось, следовательно, оставалось выбрать только уникальные последовательности, фланкирующие участок гена 16sRNA *Ornithobacterium rhinotracheale*. После ряда проведенных анализов программами **Gene Runner v.3.05** и **Primer-Blast** (в режиме on-line) эти последовательности были определены; они фланкировали участок гена размером 302 пары нуклеотидных оснований.

Праймеры (16S-1 размером 19 п.о. и 16S-2 размером 19 п.о.) были синтезированы в «Компании «Синтол» (г.Москва).

Для самой полимеразной цепной реакции было решено использовать коммерческий набор с оптимизированной буферной системой, **Taq-ДНК-полимеразой** и ингибирующими ее активностью антителами в присутствии красителя **SYBR Green I производства «Компании «Синтол» (г.Москва)**, который содержал смесь: 125 мкМ dNTP, 1.25 у Taq-ДНК-полимеразу с ингибирующими ее активностью антителами (для «горячего старта»), 1,25 мМ MgCl₂, а также 10x ПЦР-буфер и минеральное масло. Объем реакционной смеси без матричной ДНК в конечном виде составлял 25 мкл. Объем пробы матричной ДНК, вносимой в реакционную смесь, составил 5 мкл.

Культуры *Ornithobacterium rhinotracheale* были подвергнуты этапу выделения ДНК с помощью коммерческого набора «Проба-ГС» производства ООО «ДНК-Технология» (г.Москва) с сорбентной технологией очистки.

Затем нами был проведен ряд экспериментов для оптимизации протокола ПЦР.

Для процесса амплификации был использован детектирующий термоциклер «ДТ-322» производства ООО «ДНК-Технология» (г.Москва) с возможностью флуоресцентной детекции во время амплификации (режим «реального времени»). Флуоресценцию дает интеркалирующий краситель SYBR Green I,

который связывается в процессе амплификации в двухцепочечной ДНК (2). Таким образом, чем больше ампликонов образуется в процессе реакции, тем сильнее сигнал флуоресценции, а это, в свою очередь, можно применить для количественной оценки исходной матричной ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale*. Единственный недостаток применения интеркалирующего красителя заключается в том, что флуоресцирует не только специфический ампликон, но и связавшийся с неспецифическими продуктами SYBR Green I (3). Поэтому для точной оценки полученных продуктов амплификации мы применяли также метод горизонтально электрофоретической детекции в 2,3% агарозном геле.

Одновременный экспериментальный ряд содержал несколько реакционных пробирок, у которых температура отжига праймеров снижалась с 75°C до 60° с шагом в 5°C. Сам протокол проведения амплификации состоял из трех этапов: денатурации ДНК при 95°C, отжига праймеров на денатурированной ДНК, элонгации (синтеза новой цепи с помощью фермента Taq-ДНК-полимеразы, наибольшая активность которой проявляется при 72°C). Нами был выбран классический тип протокола ПЦР без предварительных «посадочных» циклов. Однако для активации Taq-ДНК-полимеразы требовалась инактивация антител, ингибирующих ее действие. После ряда проведенных опытов нами было установлено, что оптимальной температурой отжига праймеров оказалась температура 60°C. При этой температуре наблюдался максимальный продукт амплификации.

Таким образом, в конечном варианте он имел следующий вид:

1. 95°C – 5 минут – 1 цикл
2. 95°C – 10 сек
60°C – 20 сек 30 циклов
72°C – 20 сек
3. 72°C – 2 мин - 1 цикл

Аналогично опытам по оптимизации температурного режима были проведены эксперименты по оптимизации конечной концентрации праймеров в реакционной смеси. Нами было установлено, что избыток праймеров в реакции приводил к образованию неспецифических продуктов амплификации, имеющих размер продукта, не превышающего 100 п.о.

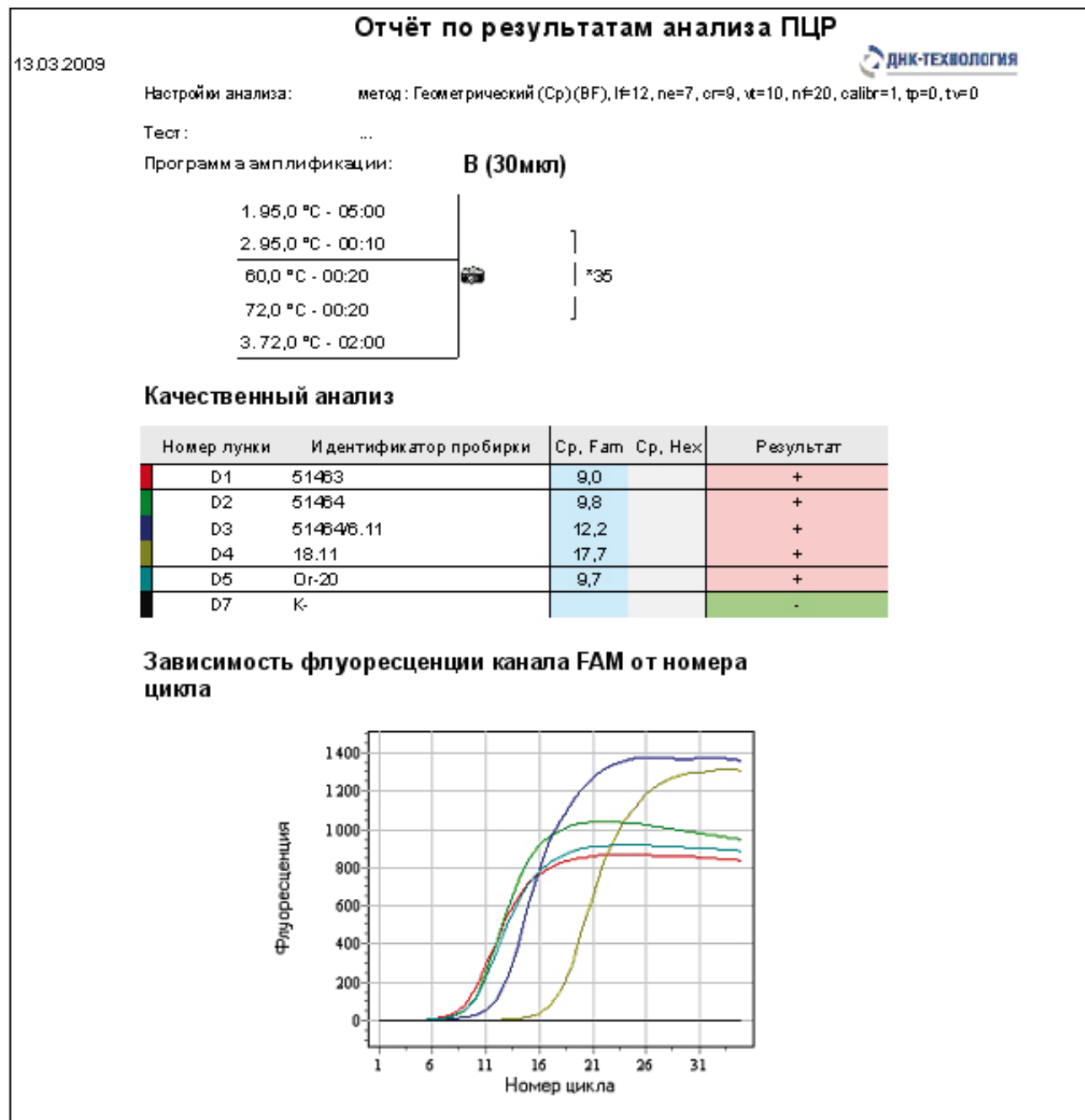


Рис 1. ПЦР-протокол детекции участка гена 16sRNA *Ornithobacterium rhinotracheale* в присутствии красителя SYBR Green I в режиме «реального времени».

Недостаток праймеров в экспериментальном ряде приводил либо к образованию продуктов амплификации слишком большой длины (>1000-2000 п.о.), либо видимой детекции не наблюдалось вовсе. Таким образом, была выявлена оптимальная концентрации праймеров в реакционной смеси – по 15 pmol 16S-1 и 16S-2.

Из-за отсутствия количественных тан-дартов ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale*, нами были определены их относительные концентрации в предложенных пробах. В ка-

честве единицы было предложено принять пробу с Cp-max. Таким образом, мы получили величины концентраций ДНК относительно их минимального количества в эксперименте (см. табл.).

Выводы.

В результате проведенной нами работы были определены специфичные праймеры, фланкирующие часть гена 16sRNA генома *Ornithobacterium rhinotracheale*. Фланкируемый участок гена 16sRNA имеет длину 302 пары нуклеотидов.

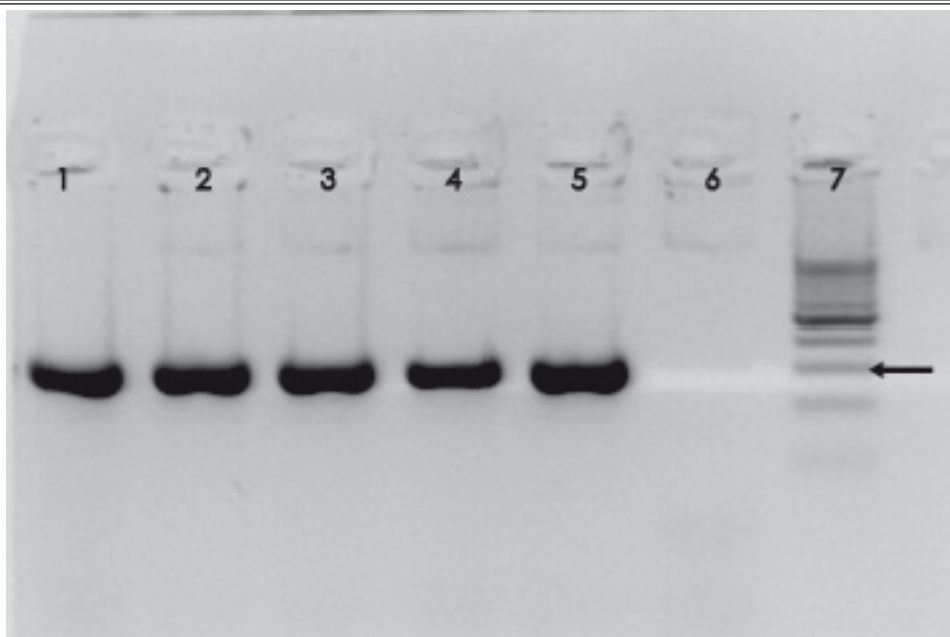


Рис.2 Электрофорез тех же продуктов амплификации в 2,3% агарозном геле (с конечной концентрацией праймеров по 15 pmol на реакциюную смесь): ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale* 1-штамм №51463, 2-штамм №51464, 3-штамм №51464/6.11, 4-штамм №18.11, 5-штамм №Or-20; 6- отрицательный контроль; 7-маркер молекулярного веса М-100.

Были подобраны оптимальные условия проведения полимеразной цепной реакции с выбранной парой праймеров в режиме «реального времени» с интеркалирующим красителем SYBR Green I. Детекция флуоресценции во время реакции позволила оценить относительное количество исходной матричной ДНК. Метод применения интеркаляторов при проведении ПЦР в режиме «реального

времени» является не столь специфичным, как применение флуоресцентных зондов, но позволяет существенно снизить материальные затраты при проведении количественного исследования. Скомпенсировать этот недостаток мы смогли проведением вторичной детекции полученных амплификатов методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Определение относительной концентрации ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale*

Номер лунки	Идентификатор пробы	Ср. Fam	Ср. Hex	Концентрация
D1	51463	9,0		394
D2	51464	9,8		228
D3	51464/6.11	12,2		43,7
D4	18.11	17,7		1,0
D5	Or-20	9,7		250
D7	К-			

Литература:

1. Красноженов Е.П. и др. Микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний // Ростов н/Д: Феникс, 2006.
2. Ребриков Д.В., Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семенов, А.М. Савилова, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов. ПЦР в реальном времени. М: Бином. Лаборатория знаний, 2009.
3. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of DNA sequences. *Biotechnology*, 1992,10:413-417.