

УДК 616:619

ПРИНЦИПЫ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ

Цапалина Е.В., студентка 3 курса факультета ветеринарной медицины
Научные руководители - *Молофеева Н.И.*, кандидат биологических наук, доцент, *Васильев Д.А.*, доктор биологических наук, профессор

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

Ключевые слова: ПЦР, олигонуклеотиды, диагностика, праймеры.

Аннотация. В статье описаны основные принципы проведения полимеразно-цепной реакции.

В настоящее время максимально ранняя диагностика возбудителей инфекций является важнейшим принципом контроля за их распространением. Обнаружение и идентификация возбудителей инфекционных заболеваний животных и птиц представляет собой одну из наиболее важных задач ветеринарной бактериологии и вирусологии. Решение этой задачи обеспечивается богатым арсеналом методических приемов, - начиная от клинических методик вирусологического и бактериологического тестирования и кончая иммунохимическими и молекулярно - биологическими методами.

Принцип ПЦР был описан в 1986 г. К. Mullis, получившим за это Нобелевскую премию в 1993 г. В основе этого метода лежит многократное копирование с помощью фермента ДНК-полимеразы определенного фрагмента ДНК, который является маркерным для данного вида. Механизм копирования таков, что комплементарное достраивание нитей может начаться не в любой точке последовательности ДНК, а только в определенных стартовых блоках — коротких двунитевых участках. Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют затравки, представляющие собой специально синтезированные *in vitro* олигонуклеотиды длиной около 20 нуклеотидов, называемые праймерами.

ПЦР имеет принципиальное преимущество перед культуральными методами. Диагностические потенции ПЦР не ограничены способностью микроба расти на искусственных средах или в культуре клеток. Поэтому основное преимущество ПЦР перед культуральными методами состоит не в высокой чувствительности ПЦР-метода (так как чувствительность этих методов сопоставима), а в способности идентифицировать и определять свойства тех микроорганизмов, которых не удастся по тем или иным причинам размножить в лабораторных условиях. Наивысшая чувствительность ПЦР обычно достигается при работе с чистой культурой микроба или, что еще лучше, с очищенной нуклеиновой кислотой. Эта чувствительность автоматически не трансформируется в чувствительность метода при работе с клиническим материалом. На успех определения при

работе с этим материалом влияют такие факторы, как методика приготовления образца, возможное присутствие ингибитора фермента, осуществляющего амплификацию, объем образца при низких концентрациях тестируемых молекул.

Наибольшее внимание среди этих методов привлекает полимеразная цепная реакция (ПЦР) в основе которой лежит многократное повторение циклов удвоения (амплификация) специфического участка нуклеотидной последовательности. Главное достоинство метода - очень высокая чувствительность: в результате амплификации концентрация специфической олигонуклеотидной последовательности в реакционной пробе возрастает в десятки миллионов раз. За последние 10 лет достигнут значительный прогресс в изучении молекулярной основы наследственных болезней и в их диагностике с помощью молекулярного анализа ДНК. В первую очередь это относится к болезням, которые вызваны мутацией в одном гене (моногенным). Каждый год увеличивается список наследственных болезней, которые могут быть выявлены методами анализа последовательности нуклеиновых оснований хромосомной ДНК. Появилась возможность с помощью исследования образцов ДНК поставить диагноз наследственного заболевания еще до появления клинических симптомов или в пренатальный период. Это позволяет выявить носителей мутантного гена при аутосомнорецессивных болезнях, а также распознать фенотипически сходные, но генетически различные заболевания. В настоящее время расширяется сфера применения этих методов. Помимо диагностики болезней с установленным типом наследования, они начинают использоваться для изучения и мультифакториальных заболеваний (коронарная болезнь сердца, сахарный диабет, опухоли и др.), а также для идентификации личности, установления отцовства и др.

В настоящее время используется несколько способов подготовки образца для проведения ПЦР. Процедура подготовки пробы включает лизис микроба и экстракцию нуклеиновой кислоты. С целью разрушения микробной клетки используют простое кипячение, замораживание—оттаивание в присутствии лизоцима, а также специальные лизирующие буферы, содержащие детергенты и протеиназу. Выбор метода, как правило, диктуется природой микроба, а точнее природой его клеточной стенки. Для экстракции ДНК используют два основных метода. Во-первых, классическую процедуру фенольно-хлороформной экстракции. При этом достигается хорошая очистка ДНК и в первую очередь от ингибиторов Taq-полимеразы, но неизбежны большие потери нуклеиновой кислоты, особенно заметные при работе с образцами небольшого объема с низкой концентрацией инфекционного агента. Другой способ, применяемый для очистки нуклеиновой кислоты, основан на использовании нуклеосорбентов. Подготовка материала с применением нуклеосорбента занимает меньше времени и более проста в исполнении, хотя не всегда может гарантировать удаление возможных ингибиторов. Зная возможности и преимущества этого метода, формулируем те направления исследований в инфекци-

онной патологии, в решении которых ПЦР начинает играть ведущую роль: — диагностика хронических инфекционных состояний, обусловленных персистенцией бактерий или вирусов, — наиболее очевидная область применения ПЦР в диагностических целях; — ПЦР — незаменимый инструмент при идентификации и молекулярно-генетических исследованиях практически всех внутриклеточных и мембранных паразитов, таких как вирусы, риккетсии, хламидии, микоплазмы; — ПЦР является наиболее эффективным способом выявления и изучения возбудителей сапронозов, которые, находясь во внешней среде в «некультивируемом» состоянии, способны там сохраняться, переживая неблагоприятные внешние условия в межэпидемические периоды; — ПЦР позволяет проводить определение антибиотикорезистентности у медленно растущих и труднокультивируемых бактерий; — технология ПЦР коренным образом изменила способы маркирования штаммов для целей эпидемиологического анализа, тем самым расширив его возможности. Теперь обратимся к конкретным примерам, которые показывают, как технология ПЦР позволяет решать перечисленные выше задачи. На настоящий момент преимущество ПЦР-анализа перед «золотым стандартом» (так красиво называют культуральный метод выявления бактерий и вирусов) состоит в следующем: 1) более высокая частота обнаружения микроба, превышающая культуральный метод на 6—7%. Эти различия объясняются возможной гибелью микроба при хранении и транспортировке, тогда как ПЦР способна обнаруживать и нежизнеспособные формы микроорганизма; 2) время, необходимое для обнаружения микроба культуральным методом, составляет около 4-6 сут., тогда как при использовании ПЦР через 4—5 ч; 3) использование технологии ПЦР позволяет проводить определение инфекционного агента в образцах, взятых не инвазивным путем. Одной из наиболее интересных сфер приложения ПЦР в эпидемиологии является использование этой технологии для мониторинга объектов внешней среды. Помимо решения чисто прикладных задач (усовершенствование методик обнаружения возбудителей в пробах воды, почвы и т. д.) в этой области, ПЦР является важным инструментом для получения фундаментальной информации о способах поддержания жизнеспособности микроорганизмов вне связи с организмом животного или человека. Большое значение приобретает метод ПЦР при контроле продуктов питания. Таким образом, технология ПЦР является мощным инструментом, обеспечивающим возможность фундаментального изучения хронических инфекционных процессов и экологии возбудителей инфекционных заболеваний.

Библиографический список:

1. Молофеева Н.И. ПЦР для диагностики герпес вируса сибирского осетра. / Н.И.Молофеева, Р.А.Абушаев, И.М. Калабеков. В сборнике: Актуальные про-

- блемы инфекционной патологии и биотехнологии // Материалы VI-й Международной студенческой научной конференции. ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА», кафедра МВЭиВСЭ. 2013. С. 71-76.
2. Молофеева Н.И. Разработка методики выявления специфического участка ДНК *Ornitobacterium rhinotracheale* с помощью ПЦК в режиме «реального времени». / Н.И.Молофеева, Д.А. Васильев, А.В. Мастиленко, А.С. Разорвина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2009. № 3 (10). С. 54-57.
 3. Васильев Д. А. Учебно-методические материалы по подготовке к лабораторным и семинарским занятиям по курсу вирусологии: Учебно-методический комплекс по дисциплине «Вирусология». Часть 2: Серологические реакции / Д.А. Васильев, В.Ю. Луговцев, Н.И. Молофеева. - Ульяновск: УГСХА, 2009. - 35 с.

PRINCIPLES OF PCR DIAGNOSIS

Tsapalina E.V., Molofeeva N.I.

Keywords: *PCR oligonucleotides, diagnostics, primers.*

Summary. *The article describes the basic principles of polymerase-chain reaction.*

УДК: 619:614.31:594:593.9:595.3

К ВОПРОСУ О БЕЗОПАСНОСТИ НЕРЫБНЫХ ОБЪЕКТОВ РЫБНОГО ПРОМЫСЛА

Чернигов С.Ю., студент факультета ветеринарной медицины
Научный руководитель – *Чернигова С.В.*, доктор ветеринарных наук, профессор

ФГБОУ ВПО «Омский ГАУ им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: *нерыбные объекты водного промысла, безопасность продуктов питания, отравления, болезни.*

Аннотация. *Работа посвящена изучению основных представителей нерыбных объектов водного промысла и определению их безопасности для предупреждения возможности заражения человека.*

В настоящее время мировые и отечественные уловы включают в основном рыбу – 92 %, объёмы улова беспозвоночных и морских растений, значительно