

чувствителен к неомицину, левомицитину, тетрациклину, каномичину, эритромицину, ампициллину, олететрину, стрептомицину, мономицину; нечувствителен к пенициллину.

Таким образом, анализ полученных результатов показывает, что тестируемые культуры эшерихий высокочувствительны к гентамицину, эритромицину и менее чувствительны к пенициллину.

1. Нечаева Л.А. и др. Чувствительность к антибиотикам эшерихий и сальмонелл, выделенных из животных в различных зонах страны. Сборник научных трудов ВГНКИ ветпрепаратов. М., 1981, с. 62-66.
2. Пашкевичус Г.Г. Острые желудочно-кишечные заболевания телят. В кн.: Актуальные вопросы борьбы с болезнями сельскохозяйственных животных, Рига, 1981, с.32-33.
3. Буряков Н., Бурякова М. Антибиотики кормовые. – "Комбикормовая промышленность", 1995, № 95, с.36.
4. Башкиров О.Г., Комплексная программа фирмы "Эланко" при бактериальных заболеваниях в промышленном свиноводстве. – "Ветеринария", 1999, №11.
5. Thomke S., Elwinger K. Growth and feed efficiency responses. K.Skogs-o.Lantbr.acad.Tidskr. 1997, V.136, N 19, p.8-15.
6. Hinders R. Ionophores can help reduce age at first calving in heifers. Feedstuff, 1998, May 12, p.12.
7. Costanzo A., Cassady J.M., Lehner C.M. Ionophores prove to be beneficial in cattle diets. Feedstuffs, 1997, 17, p.11-13.

* * *

Сұрыпталып алынған E.coli 39, E.coli 60, E.coli 64, E.coli 66 штамдарының әр түрлі антибиотиктерге сезімталдығын анықтау кезінде, аталған штамдардың гентамицин мен эритромицинге жоғары сезімтал екендігі, ал пенициллинге аздап сезімтал екендігі анықталды.

With the determination of the sensitivity of the selected strains of E.coli 39, E.coli 60, E.coli 64, E.coli 66 to different antibiotics, we established that the strains of E.coli 39, E.coli 60, E.coli 64, E.coli 66 were highly sensitive to gentamicin, to erythromycin are less sensitive to penicillin.

УДК 619:616.981.459□636.22/□28

ОПТИМИЗАЦИЯ СОЛЕВОГО СОСТАВА РЕАКЦИОННОГО БУФЕРА И КОНЦЕНТРАЦИИ ТАQ- ПОЛИМЕРАЗЫ ПРИ РАЗРАБОТКЕ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

¹Макбуз А.Ж., Чужебаева Г. Д. Ермагамбетова С.Э.

²Сандыбаев Н.Т., Жолдыбаева Е.В.

¹Казахский национальный аграрный университет

²НИИ проблем биологической безопасности НЦБ МОН РК

ПЦР (полимеразно-цепная реакция) - селективная амплификация фрагмента ДНК in vitro. Особенность ПЦР состоит в том, что амплификации подвергается область, находящаяся между участками отжига праймеров, первичная структура которых должна быть известна (или задана) заранее. Открытие метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Это позволило поднять медицинскую диагностику на качественно новый уровень. В связи с возрастающим интересом к практической ПЦР-диагностике, внедрение методов ПЦР в систему государственной ветеринарной службы — дело сегодняшнего дня [1,2].

В этой связи, разработка, адаптирование и внедрение в ветеринарную практику в Республике Казахстан тест-системы для диагностики пастереллеза крупного рогатого скота на основе ПЦР является весьма актуальной задачей.

Материалы и методы Работа проводилась в лаборатории молекулярной биологии НИИ проблем биологической безопасности НЦБ МОН РК, пгт. Гвардейский.

Наработку специфических участков ДНК проводили в термоциклере с градиентом температур TC-512, Techne.

Электрофорез продуктов амплификации ДНК бактерии *Pasteurella multocida* проводили в аппарате для горизонтального электрофореза "G-100", фирмы "Pharmacia", при напряжении 8 В/см. Для электрофореза использовали 2 % раствор агарозы в TBE-буфере. Документирование полученных результатов проводили при помощи фотографирования гелей в УФ-свете. Последующий анализ результатов проводили с использованием программы Digi-Doc-It.

Подбор оптимальных условий проведения ПЦР проводили с набором для оптимизации ПЦР – "PCR Optimization Kit II" фирмы "Sigma".

В качестве маркера молекулярных масс использовали маркер «50 bp DNA Ladder» Фирмы BioLabs.

Результаты и обсуждение

Специфичность и чувствительность ПЦР зависят не только от активности полимеразы но и от солевого состава реакционного буфера. В стандартной ПЦР используются солевые буферы на основе Трис-НСl. Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — рН, ионную силу раствора, содержит также бычий сывороточный альбумин. Изменения в буфере для ПЦР вызывают качественное или количественное изменение выхода амплификата.

Ионы двухвалентных металлов, к которым относится Mg^{2+} , являются необходимым кофактором для ДНК-полимеразы в ПЦР. В зависимости от типа используемого реакционного буфера ионы вносят в виде хлорида, сульфата или ацетата.

Для поддержания активности Таq-полимеразы нами использовался хлорид магния - $MgCl_2$. Концентрация $MgCl_2$ также влияет на отжиг праймеров и денатурацию образца. Однако избыток может вызывать неспецифичность продукта. KCl и Трис-НСl обеспечивают необходимую ионную силу и рН смеси. Хлорид калия является активатором ПЦР и его добавляют для улучшения отжига праймеров. Средние концентрации KCl стимулируют на 40-60% активность Таq полимеразы. Предельной концентрацией KCl является 50 мМ, так как последующие увеличение может привести к ингибированию полимеразы [3,4].

Оптимально разработанные концентрации $MgCl_2$, KCl и рН буфера приводят к уменьшению выхода неспецифического продукта и увеличению выхода амплификата. Обычно оптимальные концентрации перечисленных выше соединений подбираются эмпирическим путем в процессе оптимизации условий реакции. Однако существующие на сегодняшний день наборы для оптимизации ПЦР значительно упрощают эту задачу.

Для подбора оптимальных условий проведения ПЦР был использован набор для оптимизации ПЦР – "PCR Optimization Kit II" фирмы "Sigma".

В ходе работы были апробированы 10 буферных систем, которые различались концентрацией хлористого магния и калия, а также величиной рН. Состав буферных систем приведен в таблице.

Таблица Состав буферных систем, используемые при оптимизации ПЦР

№ буфера	Состав ПЦР буфера, x10
1	100 мМ Трис HCl, pH 8,3, 15 мМ $MgCl_2$, 250 мМ KCl
2	100 мМ Трис HCl, pH 8,3, 15 мМ $MgCl_2$, 750 мМ KCl
3	100 мМ Трис HCl, pH 8,3, 35 мМ $MgCl_2$, 250 мМ KCl
4	100 мМ Трис HCl, pH 8,3, 35 мМ $MgCl_2$, 750 мМ KCl
5	100 мМ Трис HCl, pH 8,8, 15 мМ $MgCl_2$, 250 мМ KCl
6	100 мМ Трис HCl, pH 8,8, 15 мМ $MgCl_2$, 750 мМ KCl
7	100 мМ Трис HCl, pH 8,8, 35 мМ $MgCl_2$, 250 мМ KCl
8	100 мМ Трис HCl, pH 8,8, 35 мМ $MgCl_2$, 750 мМ KCl
9	100 мМ Трис HCl, pH 9,2, 15 мМ $MgCl_2$, 250 мМ KCl
10	100 мМ Трис HCl, pH 9,2, 15 мМ $MgCl_2$, 750 мМ KCl

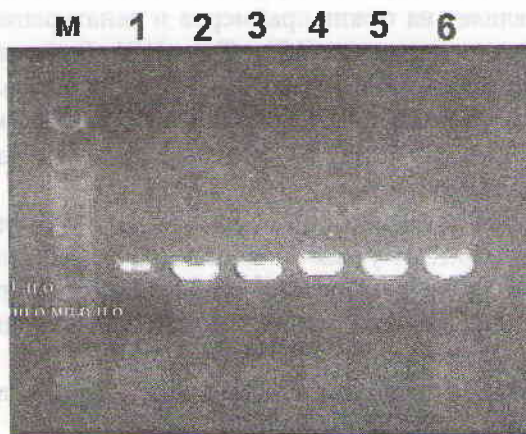
Для амплификации ДНК использовали реакционную смесь объемом 50 мкл, состоящую из:

x10 (один из 10 буферов) ПЦР буфер	- 5 мкл
x50 универсальный буфер	- 1 мкл
(20 мМ ТрисHCl, pH 8.0, 250 нМ ЭДТА)	
10 мМ dNTP mix	- 1 мкл
Праймер Pm 16SRNA- F , (20 пмоль)	- 1 мкл
Праймер Pm 16SRNA- R (20 пмоль)	- 1 мкл
ДНК <i>Pasteurella multocida</i>	- 2 мкл
Тақ ДНК полимераза (5 ед)	- 0,5 мкл
Деионизированная стерильная вода	- 38,5 мкл

По завершению наработки ДНК, полученные пробы детектировали электрофорезом в 2 % агарозном геле, приготовленном на ТБЕ буфере в присутствии бромистого этидия.

В результате проведенных исследований выяснилось, что при использовании буферных систем № 6, 7 и 10 амплификации фрагмента не происходит, что говорит об ингибировании реакции. При использовании буферных систем (№ 1,2,3,4,5,8,9) нарабатывается ПЦР-продукт размером 420 п.о.

Основная роль при проведении ПЦР отводится ферментам ДНК-полимеразам. Одна из самых популярных полимераз для стандартной ПЦР - Тақ- полимераза (Тақ- *Thermus aquaticus*). При подборе оптимальной концентрации брали активности фермента в реакционной смеси от 0,05 ед до 0,5 ед/50 мкл, и результаты амплификации проверяли гель-электрофорезом в 2 % агарозе (Рисунок 1).



Примечание - 1 – 0,05 ед; 2 – 0,1 ед; 3 – 0,2 ед; 4 – 0,3 ед; 5 – 0,4 ед; 6 – 0,5 ед; М – маркер "Direct Load™ Wide Range Marker, 10.000 п.о. - 50 п.о."

Рисунок 1. Оптимизация концентрации Тақ ДНК-полимеразы в реакционной смеси при обнаружении ДНК *Pasteurella multocida* методом ПЦР.

Как видно из рисунка концентрация Тақ ДНК-полимеразы влияет на выход конечного продукта; заметно, что с повышением концентрации фермента в реакционной смеси происходит увеличение интенсивности полос, а следовательно, и концентрации ДНК. Однако при активности фермента всего 0,05 ед нарабатывается ПЦР-продукт, который достаточно легко визуализировать в 2 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия под УФ-светом.

1 Белов Л.Г. Современные принципы доказательной диагностики инфекционных болезней в ветеринарии // Диагностика зооантропонозов (Лекционный курс). – Саратов. -2005. с. 121

2 Некоторые теоретические основы полимеразной цепной реакции // ДНК – Технологии. М. – 1998.- С. 23.

3 Ашмарин И.П. Молекулярная биология // Ленинград. – 1997.- С. 44

4 Swaminathan B., Matar G.M. Molecular Typing Methods. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. Washington: ASM Press; 1993. p. 26 - 50.

Ірі қара малдың пастереллезін ПТР әдісімен балау үшін реакциялық қоспаның құрамын үйлестіру жүргізілгенде буферлік ерітіндінің және Тақ ДНК-полимеразаның үйлесімді қоялануы анықталды.

The optimization of salt solution and concentration of taq DNA-polymeraza for diagnostic of pasterellosis of cattle are done.

УДК 619:616.981.459□636.22/□28

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ДНК PASTEURELLA MULTOCIDA

¹Макбуз А.Ж., Чужебаева Г. Д. Ермагамбетова С.Э.

²Сандыбаев Н.Т., Султанкулова К.Т.

¹Казахский национальный аграрный университет

²НИИ проблем биологической безопасности НЦБ МОН РК

Рестрикционный анализ ДНК широко используется в молекулярно-биологических исследованиях и прикладных работах и является одним из наиболее важных инструментов при изучении ДНК. Как правило, продукты расщепления ДНК анализируются с помощью гель-электрофореза в агарозном или акриламидном геле, а полученная таким образом картина разделения фрагментов ДНК в виде определенного, отличающегося для разных ферментов, набора полос и является результатом рестрикционного анализа той или иной ДНК [1]. Большое разнообразие существующих эндонуклеаз рестрикции позволяет проводить расщепление ДНК по более чем 150 сайтам узнавания. Этот метод привлекателен в силу того, что дает возможность выявить сравнительно тонкие различия в последовательностях нуклеотидов ДНК и поэтому может использоваться для дифференциации микроорганизмов на внутривидовом уровне.

Материалы и методы Работа проводилась в лаборатории молекулярной биологии НИИ проблем биологической безопасности НЦБ МОН РК, пгт. Гвардейский.

В качестве объекта исследований в работе использовали музейные штаммы *Pasteurella multocida* из коллекции лаборатории противобактериозной биотехнологии Казахского Национального аграрного университета.

В работе использовали ферменты *Apa* I, *Ceu* I, *Not*I фирмы "Sigma". Расщепление ДНК проводили в рекомендуемых производителем буферах для рестрикции ДНК при оптимальных температурах в течение 3 ч.

Гидролиз проводили в 40 мкл реакционной смеси, в которую добавляли 16 мкг ДНК, 2 мкл 10х буфера (для каждой рестриктазы использовали соответствующий ей буфер) и 1 мкл препарата фермента. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 2 ч и разделяли компоненты электрофорезом в 0,7 % агарозном геле.

Электрофоретический анализ рестрикционных фрагментов ДНК. Использовали электрофоретический аппарат "GNA-200" фирмы "Pharmacia". Электрофорез проводили при напряжении 5 В/см, при температуре 4 °С в течение 24 часов. Для электрофореза использовали 0,7 % раствор агарозы в ТАЕ-буфере с бромистым этидием в концентрации 1 мг/см³.

В качестве контроля использовали ДНК фага λ, обработанную рестриктазой *Hind*III (DNA Molecular Weight marker II (0,12-23,1 клб.)). Документировали полученные результаты фотографированием на цифровую фотокамеру "Olimpus Анализ электрофореграмм проводили с помощью компьютерной программы "LabWorks 4.0", определяли молекулярные массы рестриктов, сумму всех фрагментов рестрикции.

Результаты исследований Одним из важных элементов рестрикционного анализа является получение теоретически рассчитанной картины разделения фрагментов ДНК, определяемой на основе известной первичной структуры данной ДНК [2].

В наших экспериментах использовали рестрикционный анализ для расщепления геномной ДНК подходящими ферментами и определения размера образующихся фрагментов в геноме ДНК *Pasteurella multocida*. Молекулярный размер ДНК бактериальных клеток очень большой.

Для проведения данного исследования необходимо подобрать оптимальную рестриктазу и условия рестрикции, провести анализ и обработку электрофореграмм. На конечном этапе работы