

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 PASTEURILLA 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.

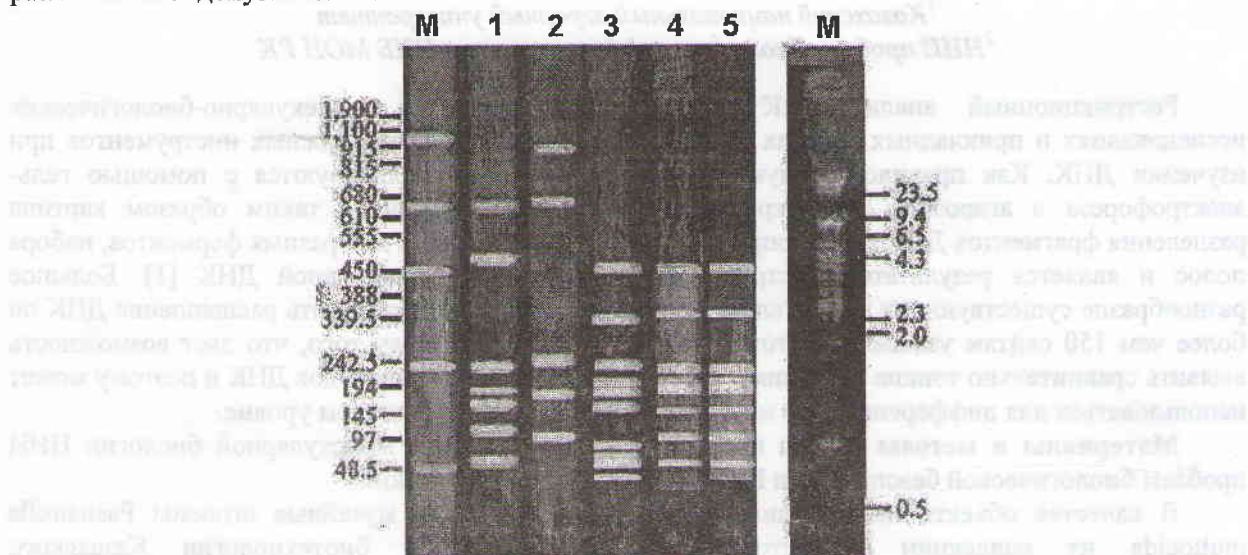
Для проведения данного исследования необходимо подобрать оптимальную рестриктазу и условия рестрикции, провести анализ и обработку электрофореграмм. На конечном этапе работы

предполагалось определить молекулярную массу геномной ДНК *Pasteurella multocida* и сравнить с данными литературы.

Первоначально были проведены эксперименты по выбору оптимальных ферментов рестрикции ДНК *Pasteurella multocida* и подбору оптимальных условий рестрикции. В экспериментах при выборе ферментов для расщепления ДНК *Pasteurella multocida* использовали следующие "крупнощепящие" рестриктазы *Apa* I, *Ceu* I, *Not* I.

Гидролиз проводили в 40 мкл реакционной смеси, в которую добавляли 16 мкг ДНК *Pasteurella multocida*, 2 мкл 10х буфера (для каждой рестриктазы использовали соответствующий ей буфер) и 1 мкл (10 ед/см³) препарата фермента, 1 мкл BSA, и 20 мкл минерального масла. В ходе опытов было опробовано несколько температурных режимов инкубации реакционной смеси. В результате экспериментов для расщепления ДНК оптимальной температурой инкубирования оказалось 37 °С в течение 2 ч.

На рисунке 1 представлен результат опыта по рестрикции генома *Pasteurella multocida* различными эндонуклеазами.



Примечание - *Ceu* I (1), *Not* I / *Ceu* I (2), *Not* I (3), *Not* I / *Apa* I (4) и *Apa* I (5). справа М – маркер стандартных размеров ДНК в килобазах, слева М- маркер, ДНК фага ϕ , обработанная *Hind* III

Рисунок 1. Электрофореграмма гидролизатов ДНК *Pasteurella multocida*, полученных с помощью обработки рестриктазами.

Из рисунка 1 видно, что при использовании данных рестриктаз получены оптимальные результаты рестрикции ДНК *Pasteurella multocida* - четкие рестрикционные профили.

Обработку полученных в экспериментах электрофореграмм проводили с помощью компьютерной программы "LabWorks 4.0". При этом для определения молекулярной массы геномной ДНК *Pasteurella multocida* определяли молекулярные массы рестриктов, их процентное содержание в пробе и сумму всех фрагментов рестрикции.

В результате исследований нами определено среднее значение молекулярной массы геномной ДНК *Pasteurella multocida*. Молекулярная масса ДНК *Pasteurella multocida* при расщеплении *Ceu* I составила 2,345кб, *Not* I - 2,349 кб, а при обработке *Apa* I – 2,353кб. Среднее значение размера ДНК *Pasteurella multocida* составило 2,249 кб.

В 1998 году Meredith L. Hunt, Carmel G. Ruffolcu Kumar Rajakumar, Ben Abler с целью физического и генетического картирования хромосомы *Pasteurella multocida* A:1 методом рестрикционного анализа генома определили молекулярную массу ДНК *Pasteurella multocida* равной 2,353кб [3].

В 2001 году Barbara J. May, Qing Zhang, Ling Ling Li, Michael L. Paustian, Thomas S. Whittam, and Vivek Kapur из Национального центра токсикологии и безопасности питания университета штата Мичиган методом случайного секвенирования и компьютерного анализа определили, что

геном штамма Pm 70 *Pasteurella multocida* - одинарная циркулярная хромосома - состоит из 2 257 487 пар оснований в длину [4].

Таким образом, данные наших исследований относительно молекулярного размера ДНК *Pasteurella multocida* совпадают с литературными, особенно с размером ДНК штаммов *Pasteurella multocida* A:1 [4]. Полученные данные в дальнейшем можно использовать для дифференциации штаммов на основе ПЦР с последующим рестрикционным анализом.

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. // Молекулярная биология клетки. – М.: Мир, 1994. – т. 1. – С. 232–233.

2 Lindblom B., Holmlund G. Rapid DNA purification for restriction fragment length polymorphism analysis // Gene Anal. Tech. – 1988. – Vol. 5. – P. 97-101.

3 Meredith L. Hunt, Carmel G. Ruffolcu Kumar Rajakumar, Ben Abler/ Physical and Genetic Map of the *Pasteurella multocida* A:1 Chromosome J of Bacteriology, No. 22 1998, p. 6054-6058 Vol. 180

4 Barbara J. May, Qing Zhang, Ling Ling Li, Michael L. Paustian, Thomas S. Whittam, and Vivek Kapur. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm 70// PNAS.-2001.- v.3. - P. 3460-3465.

* * *

*Pasteurella multocida*ның геномының ДНКсын Apa I, Ceu I, NotI эндонуклеазалармен рестрикциялық талдау пайда болған ДНК үзінділерінің көлемін анықтау үшін жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде *Pasteurella multocida*ның геномының ДНКсының молекулярлық мөлшері - 2,249 килобаза болып анықталды. Алынған нәтижелер *Pasteurella multocida*ның штаммдарын ПТР әдісімен дифференциалдауға қолдануға болады.

The retraction analysis of DNA by a endonucleaza for founding of size of a produced frayments in the gen of DNA of P.m. are researched. In the results of researched the middle quantity of molecular mass of DNA of P. m. is established as 2, 249 cbaz. Those data for identification of strains based on the PCR may be used.

ӘОЖ 619:614:9:616

БИЕЛЕРДЕ ЭМБРИОНАЛДЫҚ ӨЛІМНІҢ СЕБЕПТЕРІ ЖӘНЕ ОНЫҢ АЛДЫН АЛУ

Божбанбаев Н.П., Қойбағаров Қ.У., Мәутенбаев А.М.

Қазақ ұлттық аграрлық университеті

Жатырдағы төл өлімінің себептерін және оның нақты механизмдерін анықтау, сондай-ақ оның алдын алу, реттеу тәсілдерін құрастыру ең өзекті мәселелердің бірі болып табылады. Төл өлімі, негізінен олардың генетикалық, иммундық, төл мен анасы арасындағы эндокриндік байланыс жүйесіндегі бұзылулармен, сонымен қатар әр түрлі індеттер, жыныстық органдарда патологиялық өзгерістермен және сыртқы орта жағдайлары әсерінен қалыптасқан. Ресей және шет ел ғалымдарының көптеген эксперименталдық мәліметтеріне жүтінсек, биелерді қолдан шағылыстырғанда, барлық жағдайда нәтижелі ұрықтану 94-97%-ға жетеді екен. Бірақ, тәжірибеде ұрықтандырудың нәтижелілігі 40-45%-ды құрайды. Қалған ұрықтанған торшалар, көбінесе дамудың алғашқы кезеңінде өлімге ұшырайды. Төл өлімінің көпшілігі, жалпы саннан 80%-ға дейін немесе ұрықтанған жұмыртқа торшалар санынан 40%-ға дейін плацентарлық байланысқа дейінгі кезеңде және плацентарлық кезеңде, оның ішінде 70-80 %-ы ұрықтандырылғаннан кейінгі 1-17-күндері болады.

Ең алғаш 1914 ж J Hammond төл өлімін мегежіндерде байқаған. Оларды буаздықтың ортасында жарып көргенде, 23 төлдің 12-сі ғана дұрыс дамыған, ал қалған 11 төлдің дамуы бұзыла бастаған.

Буаздық дамуын бақылауға мүмкіндіктердің, яғни жаңа әдістер пайда болуы сүт коректілерде, жатыр ішінде даму кезеңінде тұқымдардың басым көпшілігі өлетінін көрсетті.