

Разработать технологию изготовления мази на основе действующего начала шунгита.
Ключевые слова: мазь, лечения, гнойные раны, шунгит.

УДК 619:616-07/619.3

С.Ш. Нурабаев

РГП "НИИ проблем биологической безопасности" КН МОН Республики Казахстан

ПОДБОР И СИНТЕЗ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПЦР ПРИ ЧУМЕ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Аннотация. В результате проведенных работ по отбору нуклеотидных последовательностей генома или отдельных фрагментов РНК вируса из международных баз данных показало огромное количество последовательностей для вируса чумы МЖЖ, хранящиеся в банках генов и ежедневно пополняющиеся новыми данными.

Конструирование праймеров с соблюдением необходимых параметров проводится с помощью различных компьютерных программ, основными из которых являются Primer 3, Oligo 6, Oligo Software и другие.

Сконструированные праймеры затем синтезировали на синтезаторе олигонуклеотидов Expedite 8909, согласно инструкции прилагаемой к прибору.

В результате проведенных опытов нами были подобраны и синтезированы специфические праймеры PCR_PPRV_f3 и PCR_PPRV_r3 для постановки ПЦР при чуме мелких жвачных животных.

Ключевые слова: праймер, синтез, РНК, вирус чумы мелких жвачных животных.

Введение

Праймер (англ. primer) - это короткий фрагмент нуклеиновой кислоты, который служит стартовой точкой при репликации ДНК. Праймеры необходимы ДНК-полимеразам, так как ДНК-полимеразы могут только наращивать существующую цепь. Полимеразы начинают репликацию с 3'-конца праймера, и создают копию другой цепи [1, 2].

В большинстве случаев естественной репликации ДНК, праймером для синтеза ДНК является короткий фрагмент РНК (создаваемый заново). Такой рибонуклеотидный праймер создается ферментом праймазой, и впоследствии заменяется дезоксирибонуклеотидами полимеразой, выполняющей в норме функции репарации [2].

Многие лабораторные методы в биохимии и молекулярной биологии, которые предполагают использование ДНК-полимеразы, такие, как секвенирование или полимеразная цепная реакция, требуют наличие праймеров. Такие праймеры обычно короткие, химически синтезированные олигонуклеотиды, длиной порядка двадцати оснований. Они гибридизуются с ДНК-мишенью, которая затем копируется полимеразой [3].

Важно отметить, что не совсем удачный выбор праймера может привести к появлению неспецифического продукта амплификации из-за образования "праймерного димера". Этот побочный продукт амплификации представляет собой двунитевой фрагмент, возникающий за счет отжига праймеров с их последующей достройкой Taq-полимеразой [4, 5]. Праймеры должны быть специфичны. Если их специфичность недостаточна, то вероятней всего в пробирке с реакционной смесью будут происходить нежелательные процессы, а именно синтез неспецифической ДНК. При электрофорезе

неспецифическая ДНК выявляется в виде тяжелых или легких дополнительных полос, иногда шмеров, выглядящих сплошным мазком в агарозном геле. Часть праймеров и дНТФ расходуется на синтез неспецифической ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности [6, 7].

В данной работе нами показаны подбор и синтез специфических праймеров для отработки условий постановки ПЦР, используемый для диагностики чумы МЖЖ.

Материалы и методы

Оборудование

- генетический анализатор "ABI PRISM 310 Genetic Analyser", "Applied Biosystems";
- синтезатор олигонуклеотидов Expedite 8909, Applied Biosystems;
- термоциклер GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems;
- РНК/ДНК калькулятор GenQuant Pro RNA/DNA Calculator, Amersham-Pharmacia-Biotech;
- pH-метр Delta 320 Mettler Toledo;
- универсальная цифровая система документации DigiDoc-Jt, UVP;
- системы грубой и высокой очистки воды Water Pro Ro PS/UF, Labconco;
- аппарат для электрофореза нуклеиновых кислот G-100, Pharmacia;
- цифровой фотоаппарат для фотографирования гелей, Olympus;
- пакет прикладных программ для анализа последовательностей ДНК - DNASYM MAX 1.0, Sequencher, Vector NTI, BioEdit, GENEDOC, Staden package.
- низкоскоростная рефрижераторная центрифуга "J6-NC Centrifuge", Beckman-Coulter.

Методы исследований

Синтез подобранных праймеров осуществляли на синтезаторе нуклеотидов "Expedite 8909" фирмы "Applied Biosystems" согласно протоколам, прилагающимся к прибору. Полученные олигонуклеотиды элюировали с колонок концентрированным раствором аммиака и выпаривали в вакуумном испарителе CentriVac Concentrator, LABCONCO. Синтезированные праймеры переосаждали этанолом, ресуспендировали в высокоочищенной воде и хранили при минус 20 °С.

Результаты исследований

В настоящее время ПЦР используется для детекции многих вирусных инфекций. Непосредственно для детекции нуклеиновой кислоты вируса ЧМЖ ПЦР была впервые предложена Forsyth M.A. с соавторами [8].

На начальном этапе исследований при разработке метода ПЦР для идентификации возбудителя заболевания первостепенным этапом является поиск нуклеотидных последовательностей в международных базах данных по последовательностям нуклеотидов интересующих генома вируса. Поиск проводился в трех широко известных базах данных: Ген банк (GenBank, USA), Европейская лаборатория Молекулярной биологии (EMBL Nucleotide Sequence Database, Europe) и Японская база данных ДНК (DNA Database Bank of Japan), доступная на сайте National Centre for Biotechnology Information (NCBI).

В результате проведенных работ по отбору нуклеотидных последовательностей генома или отдельных фрагментов РНК вируса из международных баз данных показало огромное количество последовательностей для вируса чумы МЖЖ, хранящиеся в банках генов и ежедневно пополняющиеся новыми данными.

В связи с этим на начальном этапе работ перед нами стояла задача анализа литературных данных по применению метода ПЦР для диагностики чумы МЖЖ.

Особое внимание заслуживают работы, вовлеченные в разработку ПЦР для идентификации вируса чумы МЖЖ. Их близкое родство и высокая гомологичность по нуклеотидным последовательностям затрудняет разработку метода, позволяющего не только идентифицировать возбудителя, но и также дифференцировать данные

заболевания. Литературные данные при разработке метода ПЦР для диагностики вируса чумы МЖЖ показывают, что основными объектами при конструировании специфических праймеров являются гены нуклеопротеина и белка слияния. NP-ген, являясь высококонсервативным участком генома для всех морбилливирусов, успешно применяется для диагностики представителей этого рода. Однако ген белка слияния (F-ген) является умеренно консервативным участком генома и может быть использован для разработки праймеров для идентификации вируса чумы МЖЖ и их дифференциации.

В связи с этим в наших работах при конструировании олигонуклеотидных затравок были использованы последовательности генов нуклеопротеина и белка слияния. В результате анализа базы данных Генбанка были сгенерированы более 40 нуклеотидных последовательностей для вируса чумы МЖЖ.

Сравнительный анализ фрагментов генов нуклеопротеина и белка слияния позволил выявить гомологичные участки среди различных штаммов вируса с целью создания специфических праймеров на данные участки (рисунки 1 и 2).

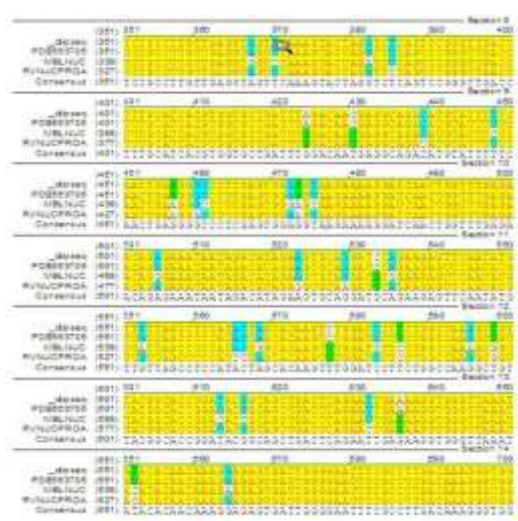


Рисунок 1 - Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности фрагментов NP-гена вируса чумы МЖЖ

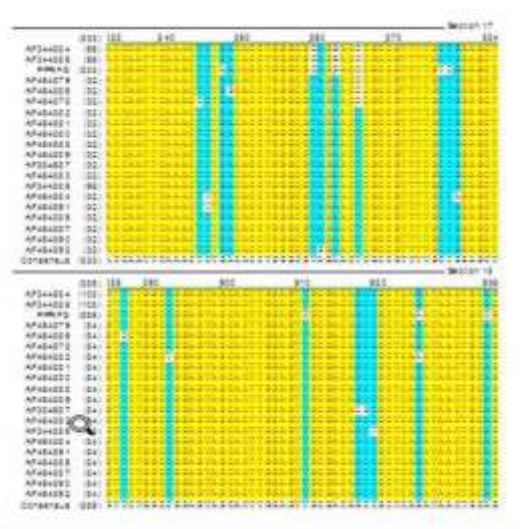


Рисунок 2 - Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности фрагментов F-гена вируса чумы МЖЖ

Эффективность метода ПЦР и его специфичность зависит от многих параметров, включающих буферный состав реакционной смеси, температурно-временной режим и специфичность подобранных праймеров. Однако, наиболее критическим этапом при разработке метода ПЦР, сказывающейся в особенности на его специфичность, является правильный подбор праймеров, его локализация на исследуемой ДНК или РНК.

Конструирование праймеров с соблюдением необходимых параметров проводится с помощью различных компьютерных программ, основными из которых являются Primer 3, Oligo 6, Oligo Software и другие. В результате проведенных работ было сгенерировано различное количество пар праймеров на проанализированные участки вируса чумы МЖЖ.

При разработке метода ПЦР для идентификации вируса чумы МЖЖ на начальном этапе исследований был проведен анализ всех имеющихся нуклеотидных последовательностей генома ЧМЖЖ в международном банке генов. Определены консервативные участки, присущие только для представителей данного рода и на данные участки были сконструированы специфические праймеры, позволяющие нарабатывать ПЦР-продукты. В данном случае также проводили предварительный отбор пула праймеров по основным критериям, предъявляемым для ПЦР праймеров. В первую очередь длина олигонуклеотида не должна была превышать 22 нуклеотида, имела допустимое процентное соотношение GC-оснований – 40-70%, температуру плавления и

прогнозируемый размер ПЦР продукта, находящийся в пределах 150-400 п.н. Предварительный набор праймеров представлен в таблице 1.

Таблица 1 - Комбинации различных пар праймеров на геном вируса чумы МЖЖ

№	Прямой праймер	Обратный праймер
1	<u>ATTGGAGAATTCAGGCTTGACA</u>	<u>TGGAACCTCTCTAGCTCAACCCCAA</u>
2	<u>GGACAAGAAATGGTACGGAGGTCA</u>	<u>CCAGGATGCTGGCCATAGTCTGCA</u>
3	<u>GGACATCAAGAGAACTCCAGGGAA</u>	<u>ATTAGAGCTGACTTTCCCGGCTGA</u>
4	<u>CACAACCCCTGATACTGCAGCTGA</u>	<u>TGTTCTGGATTGAGTTCTCCAA</u>
5	<u>CTCCTTACATGGTGATTTTGGAGA</u>	<u>CTGCTAGCCCAGGTTTCTTTCTTA</u>
6	<u>CACCTGGCCAACCTGATTCAAAGGA</u>	<u>GCTATCCTGTTACGTACTGTGTCA</u>
7	<u>ACATAGTGGAGGCAGGATTGGCTA</u>	<u>GTGTATGCTGCGATTTTCAGAGACA</u>
8	<u>GAGGATTGCTGAAATGATCTGTGA</u>	<u>CTCCTCGGTGATGCCAAGCTCAGA</u>
9	<u>TCCAGAGGGGACAGTCTGCA</u>	<u>TGGTGCCTACATCCAGTTTCTCCA</u>
10	<u>ACTCAGCTATGCATTAGGCGGAGA</u>	<u>CCTGAAGCAATGGGCTCATTGGA</u>
11	<u>AGATCCTGTCTATATTCGGGCCTA</u>	<u>GAAGACGCATGACGTCTCATCGAA</u>
12	<u>GCCTGTAGAGGATGCCCTGTCA</u>	<u>AATACCTAAGGAGCTTGAGACTGA</u>
13	<u>CAAAATCGTGCGCCAGAACCCTA</u>	<u>AACAGTCTTCAGTATCTGGTCTGA</u>
14	<u>CACAGTGTTAAAGCCTGTAGAGGA</u>	<u>GCTTGAGACTGAGTTTGTGACCTA</u>
15	<u>CCAATGAGCCCATTGCTTCAGGA</u>	<u>GCATTCTCCAGTCTTGTGACTGCA</u>
16	<u>CAAATTGTGCGTCAGTTTTGTGCA</u>	<u>GACAAGCCCTAGGGATACCCCAA</u>

Из всего пула конструированных праймеров на первом этапе для дальнейших исследований отобраны пять пар праймеров для разработки ПЦР. Параметры праймеров представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Краткие характеристики праймеров для постановки ПЦР при идентификации вируса ЧМЖЖ

№	Последовательность (5'-3')	поз. на геноме	T _m , °C	T _a , °C	GC, %	ПЦР продукт
1	GGA CAC CCA ACC ACC GAA ACA (PCR_PPRV_f1)	4974	75,8	61,4	57,1	200
	TTC CCT GCC GTT TGG TC (PCR_PPRV_r1)	5157	69,2		58,8	
2	ATC CAG AGT CGG CTG AAT ACC(PCR_PPRV_f2)	7533	68,9	53,3	52,4	343
	GCC CAA GAG TCA ATG ATT GC(PCR_PPRV_r3)	7856	69,1		50,0	
3	TGC CGT CTA CCG ATG TT	8425	64,5	54,6	52,9	230
	AAG ATC CAT GCC AGA TAG GTG	8634	67,4		47,6	
4	CGT TGC CAT GTT CCC ATA GAA	8802	71,0	54,3	47,6	325
	CGG TCA GCC CTC TCG TAT	9109	67,3		61,1	

5	CAA AGA AAG GGC AGT GTT ATC (PCR_PPRV_f3)	12643	64,9	55,3	42,9	274
	ACA CGA AGA GCC GAA GTC (PCR_PPRV_r3)	12899	64,9		55,6	

Сконструированные праймеры затем синтезировали на синтезаторе олигонуклеотидов Expedite 8909, согласно инструкции прилагаемой к прибору. Очистку праймеров проводили методом спиртового переосаждения, конечную концентрацию праймера довели до 20 пг.



Рисунок 3 - Локализация специфических праймеров PCR_PPRV_f3 и PCR_PPRV_r3 на геноме вируса чумы МЖЖ

Проведенные эксперименты по выбору пары праймеров показали, что оптимальными оказались праймеры PCR_PPRV_f3 и PCR_PPRV_r3, позволяющие нарабатывать ПЦР продукт размером 274 п.н. гена полимеразы.

Вывод

В результате проведенных опытов нами были подобраны и синтезированы специфические праймеры PCR_PPRV_f3 и PCR_PPRV_r3 для постановки ПЦР при чуме мелких жвачных животных.

Литература

1. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. Биологическая химия - 3. - амплификации Москва: Высшая школа, 2000. - 479 с. - 7000 экз. - ISBN 5060037207.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение - Москва: Мир, 2002. — 589 с. - ISBN 5030033289.
3. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: в трех томах - 2. - Москва: Мир, 1994. - Т. 1. - 517 с. - 10000 экз. - ISBN 5030019855.
4. Dieffenbach C. and Dveksler G. PCR Primer: A Laboratory Manual // Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003-700p.
5. Barlett J. and Stirling D. PCR Protocols // Methods in molecular biology, 2003.-V.226, 556p.
6. Горбунова В.Н. Молекулярные основы медицинской генетики.// СПб.: Интермедика, 1999.-210с.

7. Охапкина С.С., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х. Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) и ее применение. <http://www.sciencerussian.sibenzyme.com>

8. Forsyth M.A. & Barrett T. (1995). Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. // Virus Res. -Vol. 39. -№. 2-3. -P. 151-163.

С.Ш. Нурабаев

ҰСАҚ КҮЙІС ҚАЙЫРАТЫН МАЛДАРДЫҢ ОБАСЫН ПТР ӘДІСІМЕН АНЫҚТАУ ҮШІН ТӘНДІ ПРАЙМЕРЛЕРДІ СИНТЕЗДЕУ

Ұсақ күйіс қайыратын малдардың обасын ПТР әдісімен анықтау үшін праймерлер іріктелініп алынды және синтезделінді.

Кілт сөздер: праймер, синтез, РНК, ұсақ күйіс қайыратын малдар обасы.

S.Sh. Nurabayev

RECRUITING AND SYNTHESIS OF SPECIFIC PRIMERS FOR PCR WITH THE PLAGUE OF SMALL RUMINANTS

Chosen and synthesizing primers for statement PCR at a peste des petits ruminants

Keywords: primer, synthesis, RNA, peste des petits ruminants virus.

УДК 619:578.831.2:57.083.138

С.Ш. Нурабаев

*РГП Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, ПГТ
Гвардейский Жамбылской области, Казахстан*

ПОДБОР СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ СРЕД ДЛЯ ЛИОФИЛЬНОЙ СУШКИ АНТИГЕНА ПРИ ЧУМЕ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Аннотация. При исследовании различных стабилизирующих сред, добавляемых в диагностические препараты при их лиофилизации, испытаны различные их концентрации, а также компонентный состав.

В ходе проведенных опытов установлено, что кроме стабилизатора Сахароза/Желатин/Агар, 7,5/1,5/0,2% остальные испытанные защитные среда в два, иногда в восемь раз снижают активность специфических антигенов чумы МЖЖ после процесса лиофильной сушки.

В ходе опытов подобрана оптимальная защитная добавка для антигенов при чуме мелких жвачных животных, которой является Сахароза/Желатин/Агар, в концентрации 7,5/1,5/0,2% соответственно.

Ключевые слова: стабилизатор, желатин, сахароза, агар, пептон

Введение

Одним из главных моментов при приготовлении диагностических препаратов при чуме мелких жвачных животных является подбор стабилизирующих сред в процессе лиофильной сушки материалов. Для лиофильной сушки диагностических препаратов в научных и производственных учреждениях в качестве стабилизирующих сред широко