

УДК 619:616.98.578-076:636.4

ВЛИЯНИЕ АКТИВНОСТИ ПОЛИМЕРАЗ НА НАКОПЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПРИ ПЦР-ДИАГНОСТИКЕ БОЛЕЗНЕЙ СВИНЕЙ

Красникова Е. Л.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С. Н. Вышелесского»
г. Минск, Республика Беларусь

Парвовирусная болезнь свиней и репродуктивно-респираторный синдром (РРСС) входят в комплекс заболеваний, вызывающих как репродуктивную, так и респираторную патологии, принося значительный экономический ущерб свиноводческим хозяйствам [1, 2].

В последнее время для диагностики широко применяют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на ферментативной (с участием ДНК Таq-полимеразы) амплификации специфических участков генома [1, 4]. Данный метод чувствительный, специфичный, прост в исполнении и, кроме того, позволяет выявлять вирус, несмотря на его связанность с антителами. Изменение активности (количества) полимеразы часто приводит к уменьшению синтеза конечного продукта или появлению диффузных спектров [3, 4].

Поэтому изучение влияния активности полимераз на накопление продуктов амплификации является одним из важных этапов в создании ПЦР-диагностикомов. Нами изучено влияние разного количества ДНК полимераз на образование продукта амплификации при ПЦР-диагностике парвовирусной болезни свиней и РРСС. Для работы использовали: – PrimeTaq ДНК-полимеразы, с буферами фирмы «Праймтех» (РБ) с активностью 5 ЕД/мкл (Исследуемая активность 0,5-4, 5, 7 ЕД); – Tip-mix полимеразы УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», ТУ ВУ100185093.067-201, с буфером для амплификации, активностью 2 ЕД/мкл (исследуемая активность 0,3-2 ЕД).

ПЦР проводили при следующих температурных режимах: 1. 95°C 5 мин, 2. 94°C 45 сек; 58,6°C 60 сек; 72°C 60 сек – 35 циклов, 3. 72°C 10 мин, 4. 10°C хранение, с базовыми параметрами ПЦР-смеси в объеме 50 мкл: 5хПЦР буфер, 1 мМ хлорида магния, 200 μМ каждого dNTP, 0.1 μМ каждого праймера, 5 мкл ДНК. Для диагностики РРСС использовали cDNA ранее выделенного штамма вируса РРСС и эпизотического изолята. После проведения амплификации ПЦР продукты подвергали электрофоретической детекции в 2% агарозном геле с учетом результатов на Gel Doc XR в программе imageLab Software, BIO-RAD (США).

Согласно полученным нами результатам, обе полимеразы хорошо работали в концентрациях: 0,5- 4 ЕД (Праймтех) с ДНК возбудителя парвовирусной болезни свиней и РРСС; - 0,8-2 ЕД («ХОП ИБОХ НАН Беларуси») с ДНК возбудителя парвовирусной болезни свиней и 0,3-2 ЕД с сDNA РРСС. Оптимальная рабочая активность полимеразы фирмы Праймтех составила 0,5-2 ЕД; фирмы ИБОХ – 0,8-2 ЕД.

Более высокие концентрации полимеразы фирмы Праймтех (3-4 ЕД) приводили к образованию диффузных спектров. При активности полимеразы фирмы ИБОХ 0,3-0,5 ЕД продукта амплификации накапливалось столь мало, что при детекции в электрофорезе бэнды были едва различимы [4].

Оптимальная рабочая активность полимеразы фирмы Праймтех с сDNA европейского штамма вируса РРСС составила 0,5-4 ЕД; фирмы ИБОХ – 0,3-1 ЕД (Увеличение активности полимеразы в смеси приводило к незначительной ингибции и снижению накопления ПЦР-продукта).

Оптимальная рабочая активность полимеразы фирмы Праймтех с сDNA эпизоотического изолята вируса РРСС составила 0,5-1 ЕД, (увеличение активности полимеразы (2-7Ед) приводило к образованию диффузных спектров и неспецифических продуктов; фирмы ИБОХ – 0,5-2ЕД).

Проведенные нами исследования показали возможность использования PrimeTaq ДНК-полимеразы и Tip-mix полимеразы в ПЦР-диагностике парвовирусной болезни свиней и РРСС. Более высокая (0,3-1 ЕД) эффективность использования Tip-mix полимеразы в ПЦР-диагностике РРСС, по-видимому, обусловлена тем, что данный реактив, согласно инструкции, представляет собой смесь полимераз, обладающих устойчивостью к ингибиторам ПЦР и способностью исправлять возникающие в ходе амплификации ошибки при встраивании нуклеотидов, что уменьшает число образующихся неспецифических фрагментов и повышает специфичность реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Орлянкин Б. Г. Инфекционные респираторные болезни свиней: этиология, диагностика и профилактика / Б. Г. Орлянкин, А. М. Мишин // Свиноводство. – 2010. – № 3. – С. 67-69
2. Зеленуха Е. А. Мероприятия при респираторных болезнях свиней в промышленных комплексах / Е. А. Зеленуха, А. Н. Гречухин // Ветеринария. – 2007. – № 5. – С. 13-15
3. Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. - М.: Юнипол, 2007. - 176 с.
4. Ребриков Д. В., Саматов Г. А., Трофимов Д. Ю. и др ПЦР "в реальном времени" - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. - 223 с.