

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ПІДХІД ДО ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН НА МОДЕЛІ ХЛАМІДІОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Н.М.Шкавро , О.В.Щербак
Інститут тваринництва УААН

*У статті розглянуто різні методи виділення ДНК із соматичних та статевих клітин ссавців. Наведено результати ходу реакції ланцюгової полімеризації по виявленню збудника хламідіозу (*Chlamidia trachomatis*) у спермі бугаїв-плідників.*

ДНК, штучне запліднення, полімеразна ланцюгова реакція, *Chlamidia trachomatis*

Одним із завдань сучасної біотехнології є створення ефективної технології одержання тварин із заданими ознаками і збереження генетично цінних тварин. Однак необхідно попередньо обстежувати генетичний матеріал: ембріони, зародкові клітини, сперму, культури клітин, а також сироватки на наявність контамінантів вірусної та бактеріальної природи. Тому, актуальною і важливою є проблема розробки методів ранньої і точної діагностики збудників інфекційних і спадкоємних захворювань сільськогосподарських тварин.

Робота по збереженню та поліпшенню високогенетичного потенціалу порід великої рогатої худоби неможлива без штучного запліднення, але при цьому не виключається можливість передачі вірусної або бактеріальної інфекції, у тому числі хламідійної, через сперму інфікованих бугаїв-плідників, що призводить до абортів, народження нежиттєздатного або слабкого молодняку, виникнення вагінітів, ендометритів у корів, і, як наслідок, до розвитку неплідності [1].

На сучасному етапі розвитку біотехнології для цієї мети активно використовують методи ДНК-технологій, що дають можливість тестування присутності генетичного матеріалу інфекційного агента в геномі хазяїна [2]. На нашу думку, найбільш інформативним, високочутливим і специфічним серед них є полімеразна ланцюгова реакція. Вона дає змогу збільшити специфічну послідовність ДНК шляхом її багаторазового копіювання до кількостей, які можна детектувати.

При діагностиці багатьох інфекцій методом ПЛР не потрібне збереження цілісності структур збудника і його біологічної активності. Ще важливою перевагою ПЛР є швидкість її проведення (близько 3-4 год.), а також можливість діагностики не тільки свіжих гострих, але і хронічних форм інфекцій. Особливо ефективний метод ПЛР при діагностиці важко культивуємих та взагалі некультивуємих форм патогенних мікроорганізмів. Аналіз за допомогою цього методу може бути використаний не тільки для іденти-

фікації вірусних інфекцій, але і при дослідженнях, пов'язаних з оцінкою стадії захворювання, ефектів противірусної терапії, прогнозу захворювання [3].

Для виділення ДНК із біологічного матеріалу, який необхідно перевірити на наявність інфекції, у даний момент існує багато різних методів. Метою даної роботи була апробація двох різних методів виділення ДНК із соматичних та статевих клітин ссавців і постановка полімеразної ланцюгової реакції по виявленню збудника хламідіозу (*Chlamidia trachomatis*) у спермі бугаїв-плідників.

Матеріали і методи дослідження. Ми досліджували сперму бугаїв-плідників, отриману за Харківською технологією, яку брали зі спермобанку відділу біотехнології репродукції сільськогосподарських тварин ІТ УААН, що зберігалася в гранулах по 0,25мл у рідкому азоті при $T -180^{\circ}\text{C}$. А також кров мишей лінії СВА, яку відбирали в об'ємі не менше 0,5 мл, з додаванням антикоагулянту, яким виступали 2,1М цитрат натрію, з розрахунку 1/10 об'єму крові, і 0,5М ЕДТА (динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти). При відсутності цих реактивів, кров під час забирання дефібрилювали круговими рухами скляної палички в колбочці протягом 5-7 хвилин.

Виділення ДНК проводили двома методами: 1) з використанням сорбенту Chelex-100 [4-5]; 2) з використанням готового набору реагентів GenePak фірми БіоКом (Росія). При проведенні ПЛР використовували набір реагентів GenePak по виявленню збудника хламідіозу (*Chlamidia trachomatis*), ампліфікатор - модель 105 Кольцово (Росія). Для детекції продуктів реакції застосовували горизонтальний електрофорез в агарозному гелі, гель потім переносили на трансїлюмінатор ТУВ-2, що випромінює світло в ультрафіолетовому діапазоні 365 нм. Результати оцінювали за наявністю або відсутністю фрагментів ДНК певного розміру, що світилися.

Результати дослідження. Процедура виділення ДНК за допомогою сорбенту Chelex-100 проводили в такий спосіб:

1. відмивали кілька разів сперму від білків й інших забруднюючих речовин за допомогою значної кількості дистильованої води;
2. осад ресуспензували в рівному обсязі ТЕ-буфера (trisHCl , ЕДТА);
3. додавали сорбент Chelex-100, протеїназу К, дитіотрейтол;
4. інкубували при 56°C , потім інкубували на водяній лазні при 100°C , центрифугували;
5. отримані проби ДНК зберігали заморожуванням при -20°C . У такому стані вони можуть зберігатися тривалий час.

Другий метод – за допомогою набору реагентів GenePak для проведення полімеразної ланцюгової реакції по виявленню *Chlamidia trachomatis* у біологічних пробах ссавців, до складу якого входять компоненти реактивів для пробопідготовки: лізуючий реагент, сольовий буфер, суспензія сорбенту і суспензія суміші гранул іонообмінників.

У результаті застосування цих двох методів, нами була виділена ДНК, яку потім піддавали електрофоретичному розподілу в 0,7% агарозному гелі при накладенні електричного поля напругою 200V протягом півгодини, в якості барвника ДНК використовували бромистий етидій [6]. По закінченні

електрофорезу, гель проглядали на транслюмінаторі ТУВ-2. Спостерігали інтенсивне свічення у лунках 0,7% агарозного гелю, що свідчить про успішне виділення ДНК (рис. 1).

Рис. 1.
Електрофореграма
виділених ДНК після
фарбування 0,7%
агарозного гелю
бромистим етидієм



Оскільки хламідійна інфекція є достатньо поширеною серед практично всіх видів ссавців, і зокрема, сільськогосподарських тварин, наносить істотний економічний збиток, викликаючи загибель тварин, патологію їх відтворних органів, аборти, важливе значення має як можна більш раннє і достовірне виявлення збудника. Крім того, хламідіози в умовах обмеженої етіологічної діагностики набули репутації хвороб, які надзвичайно важко піддаються лікуванню [1]. Ми провели полімеразну ланцюгову реакцію по виявленню збудника хламідіозу (*Chlamidia trachomatis*) у спермі бугаїв за допомогою набору реагентів GenePak. Температурний режим проведення ПЛР: денатурація ДНК при 95⁰С – 2 хв., відпал праймерів при 62⁰С – 1 хв., синтез компліментарних ланцюгів при 74⁰С – 2 хв. Далі 43 циклу за схемою: денатурація ДНК при 95⁰С – 1 хв., відпал праймерів при 58⁰С – 40 сек, синтез компліментарних ланцюгів при 74⁰С – 1 хв. Синтез в останньому циклі при 74⁰С – 2 хв.

Детекцію продуктів реакції проводили шляхом електрофоретичного розподілу молекул ДНК у 2% агарозному гелі, напруга поля 150V.

У результаті проведеної роботи нами не виявлена присутність інфекційного агента в жодній із проб сперми (рис. 2). Про це свідчить відсутність

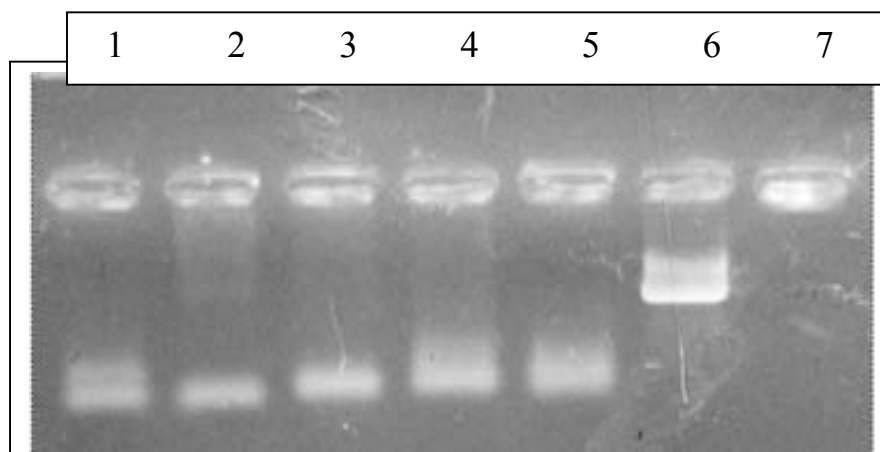


Рис.2. Електрофореграма продуктів ПЛР для виявлення ДНК *Clamidia trachomatis*: доріжки 1–5 – проби сперми; 6 – позитивний контроль; 7

смуг у зразках проб сперми (1, 2, 3, 4 і 5) напроти смуги позитивного контролю (6). Відсутність смуги в негативному контрольному зразку (7) на рівні позитивного контролю свідчить про відсутність контамінації.

Висновки:

1. Використовуючи обидва методи виділення ДНК, ми одержали ДНК у якості і кількості достатньої для подальшого її використання в полімеразній ланцюговій реакції. Однак при роботі з готовими наборами реагентів, практично виключається можливість модифікування окремих етапів процесу виділення, що неприйнятно в науково-дослідних роботах, де необхідно змінювати умови перебігу процесу в залежності від мети експерименту.

2. У результаті проведення ПЛР по виявленню збудника хламідіозу (*Clamidia trachomatis*) у спермі бугаїв-плідників нами не виявлена присутність інфекційного агента в жодній із проб сперми.

Бібліографічний список

1. Косенко М.В., Авдос'єва І.К. Лікування хламідіозу великої рогатої худоби // Вісник аграрної науки.- 2001.- №8.- С.28-29.

Глазко В.І. Використання методів ДНК-технологій у селекційному процесі // Вісник аграрної науки.-1999.- №1.- С.45-50.

Стегний Б.Т., Коваленко А.М., Королев А.Г. Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) в диагностике инфекционных заболеваний животных: Метод. Пособие.-Х.:НБЦ ИЭКВМ, 2003.- 41 с.

GenePrint™ STR Systems Technical Manual, Promega Corp.- 49 с.

Використання аналізу ДНК у судово-медичних експертизах /За ред. Ю.М.Сиволапа.- Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2001. – 92с.

Маниатис Т., Фрич Э. Молекулярное клонирование. Методы.-М.: Мир, 1984.- С.156-185.

В статье рассмотрены разные методы выделения ДНК из соматических и половых клеток млекопитающих. Приведены результаты проведения полимеразной цепной реакции по выявлению возбудителя хламидиоза (Clamidia trachomatis) в сперме быков-производителей.

In article considered different methods of the separation DNK from somatic and sexual mammal's cells. Adduction results of conduction polimerase chain reaction on revealing the Clamidia incitant (Clamidia trachomatis) in oxen-producers semen .