

7. Pavio N. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks / N. Pavio, X.J. Meng, C. Renou // Vet. Res. – 2010. – № 41(6). – P. 46.
8. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus / X.J. Meng [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 1997. – № 94. – P. 9860-9865.
9. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan / H. Sonoda [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2004. – № 42. – P. 5371-5374.
10. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States / G. Haqshenas [et al.] // J. Gen. Virol. – 2001. – № 82. – P. 2449-2462.
11. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China / C. Zhao [et al.] // J. Med. Virol. – 2009. – № 81. – P. 1371–1379.
12. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR / R. Johne [et al.] // J. Gen. Virol. – 2010. – № 91. – P. 750–758.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ 2 ТИПА РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ

Красочко П.П., д.б.н., доцент УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Би Кайсюань, м.в.н. УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Кугелев И.М., к.в.н., доцент ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА, г. Смоленск, Россия

***Аннотация.** В ходе эксперимента была определена эффективность выделения ДНК цирковируса свиней 2 типа методами преципитации нуклеиновых кислот, сорбции на неорганическом сорбенте или микроцентрифужных колонках. Результаты показали наибольшую эффективность выделения ДНК цирковируса свиней 2 типа методом преципитации нуклеиновых кислот.*

***Ключевые слова:** Выделение ДНК, цирковирус свиней 2 типа, сорбентный метод, метод преципитации, колоночный метод.*

Введение. При диагностике инфекционных болезней животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) выделение нуклеиновых кислот является определяющим фактором успеха выявления генома возбудителя при условии использования оптимизированных компонентов самой ПЦР. Абсолютное большинство диагностических ПЦР тест-систем поставляется без набора для выделения нуклеиновых кислот, и перед специалистом возникает вопрос: какой из имеющихся методов наиболее эффективен?

Безусловным лидером, как по количеству, так и по качеству получаемой после выделения ДНК является метод фенол-хлороформной экстракции. Однако, ввиду особых требований к защите персонала от вредных веществ, а также длительности процесса выделения он применяется крайне редко, и в основном, в научных целях. Ему на замену пришли методы преципитации или сорбции на нерастворимом сорбенте. Они обладают рядом преимуществ, самые главные из которых – относительная безопасность и скорость выделения нуклеиновых кислот. Качество выделяемой ДНК несколько хуже по сравнению с классическим методом, но оно приемлемо для использования в ПЦР.

Целью работы являлось определение наиболее оптимального способа выделения ДНК цирковируса 2 типа.

Материалы и методы. В качестве материала для выделения ДНК использовали наиболее сложную матрицу – гомогенат паренхиматозных органов. По сравнению с другим материалом для исследования (кровь, сыворотка крови, смывы, фекалии) она содержит большое количество компонентов – белков, жиров, углеводов, ферментов, полисахаридов и т.п., которые могут выступать как ингибиторами ПЦР, так и мешать компонентам набора для выделения эффективно экстрагировать ДНК.

Исследуемый материал был получен от павших поросят, в органах и тканях которых было подтверждено наличие ДНК цирковируса 2 типа методом ПЦР в «реальном» времени.

Для выделения ДНК использовали коммерческие наборы для выделения нуклеиновых кислот, которые можно условно разделить на 3 вида:

1. Набор для выделения ДНК/РНК методом сорбентной экстракции (Производитель 1, Производитель 2).
2. Набор для выделения ДНК/РНК методом преципитации (Производитель 3).
3. Набор для выделения ДНК/РНК колоночным методом (Производитель 4).

В основе наборов Производителей 1 и 2 лежит метод выделения ДНК с использованием нерастворимого сорбента, на который в присутствии буферных растворов осаждается ДНК и переходит в нерастворимое состояние. Путем последовательных промывок сорбента промывочными растворами из состава набора происходит очистка ДНК от ненужных примесей и ингибиторов. На заключительной стадии ДНК элюируется с сорбента деионизированной водой или ТЕ-буфером.

В методе преципитации ДНК/РНК переводится в нерастворимое состояние гуанидин изотиоционатом и спиртовыми растворами, а образовавшийся преципитат отмывается промывочными растворами. На последней стадии осадок подсушивается и растворяется в деионизированной воде или ТЕ-буфере.

Принцип колоночного метода аналогичен сорбентному методу, с тем отличием, что сорбент находится в центрифужной микроколонке, через которую проходит исследуемый материал под действием центробежной силы

при центрифугировании. Преимуществом данного метода является более высокая скорость выделения нуклеиновых кислот.

Для выделения ДНК цирковируса свиней 2 типа готовили 20% суспензию на физиологическом растворе из растертых в ступке с песком органов. Для выделения использовали надосадок в объеме 100 мкл для всех наборов. В дальнейшем следовали инструкции производителя по применению соответствующего набора.

Оценку эффективности выделения ДНК цирковируса свиней 2 типа проводили методом ПЦР в «реальном» времени путем определения C_t для каждой исследуемой пробы, которые ставили в двух повторах и вычисляли среднее арифметическое значение.

Результаты исследования. Предварительное исследование гомогенатов тканей показало высокое содержание вирусной ДНК в связи с чем, для постановки основного опыта было проведено разведение выделенной ДНК в 10 и 100 раз, после чего была поставлена ПЦР в «реальном» времени с помощью коммерческих наборов для выявления генома цирковируса свиней 2 типа.

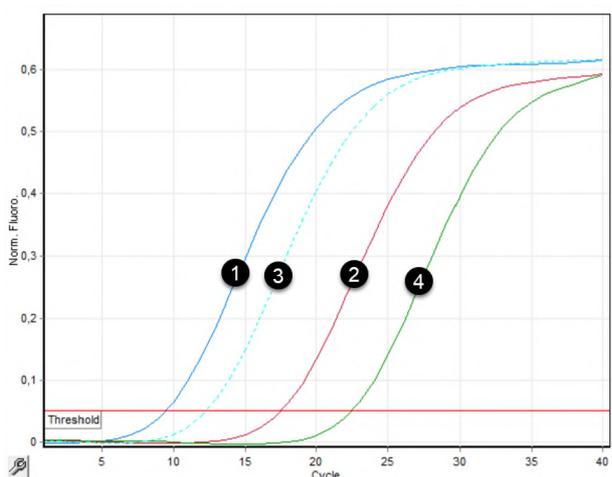


Рисунок 1 – Амплификация пробы №1 (разведение 10х)

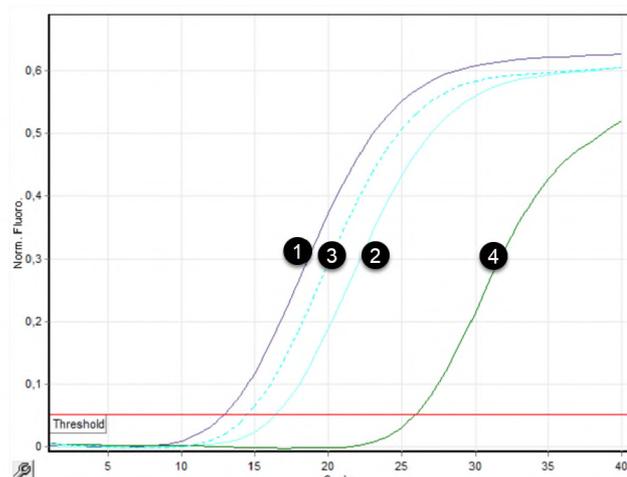


Рисунок 2 – Амплификация пробы №2 (разведение 10х)

1- Метод преципитации (производитель 1); 2- сорбентный метод (производитель 2);
3- сорбентный метод (производитель 3); 4- колоночный метод (производитель 4)

Таблица 1 – Значения C_t для исследуемых проб

Исследуемый образец	Значение C_t при методе выделения			
	Метод преципитации (произв. 1)	Сорбентный метод (произв. 2)	Сорбентный метод (произв. 3)	Колоночный метод (произв. 4)
Проба №1 (разведение 10х)	9,47	17,54	12,28	22,46
Проба №1 (разведение 100х)	12,78	21,09	15,50	26,60
Проба №2 (разведение 10х)	12,91	16,43	14,51	25,93
Проба №2 (разведение 100х)	16,52	19,76	17,87	30,11

Разведенные в 10 раз пробы показали положительный результат для всех методов выделения ДНК (рисунки 1, 2). Однако, все они отличаются по скорости выхода кривой амплификации (Таблица 1).

При невозможности количественной оценки исходной геномной нагрузки, анализ значений C_t является оптимальным методом оценки эффективности ПЦР или выделения нуклеиновых кислот. Данный показатель отражает относительное содержание ДНК в пробе: чем выше концентрация целевого фрагмента, тем быстрее возрастает уровень флуоресценции до регистрируемого. Таким образом, пробы с более низким значением C_t содержат большее количество искомой ДНК.

Анализ результатов амплификации ДНК из исследуемого материала показывает, что метод преципитации нуклеиновых кислот является наиболее эффективным. Для пробы №1 разница между ним и следующим по эффективности сорбентным методом составила 2,72-2,81 цикла, а для пробы №2 1,35-1,6. Учитывая, что при 100% эффективности ПЦР разница в 2,71 цикла соответствует 10-ти кратному разведению, можно заключить, что метод преципитации в 10 раз эффективнее выделил ДНК из пробы №1 и в 5 раз эффективнее из пробы №2.

Между сорбентными методами выделения разных производителей также наблюдаются различия. Набор производителя №3 оказывается эффективнее и выделяет ДНК в более высокой концентрации. Таким образом, не только метод выделения, но и входящие в состав набора компоненты также определяют эффективность выделения ДНК.

Наихудшие результаты продемонстрировал колоночный набор для выделения нуклеиновых кислот. Максимальное отставание от наиболее эффективного набора составило 13,82 цикла, что не приемлемо в ПЦР-диагностике вирусных болезней.

Заключение

Проведенный эксперимент показал наилучшую эффективность преципитирующего метода выделения ДНК цирковируса свиней 2 типа, как выделяющего нуклеиновые кислоты в наибольшей концентрации. При этом, сорбентный метод выделения также показывает высокую эффективность. Однако, следует учитывать, что эффективность выделения ДНК одинаковым методом, но с использованием наборов разных производителей, может существенно различаться. В связи с этим, при выборе оптимального способа выделения ДНК следует руководствоваться экспериментальными данными, полученными в ходе сравнительного исследования эффективности наборов разных производителей.

Список литературы:

1. Красочко П.П. Молекулярно-генетические, иммунологические и физические основы борьбы с инфекционным ринотрахеитом крупного рогатого скота : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.01.06 / П. П. Красочко ; ФГУ ВНИТИБП РАСХН. – Щелково, 2018. – 46 с.

2. Красочко П.П. Результаты выделения ДНК вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота из различных вирусосодержащих объектов / П.П. Красочко, М.Е. Михайлова, С.Г. Голенченко // Проблемы повышения эффективности производства животноводческой продукции : тез. докл. Междунар. науч.-практ. конф. (12-13 окт. 2007 г.) / Науч.-практ. центр НАН Беларуси по животноводству. – Жодино, 2007. – С. 333-335.

3. Basic DNA and RNA Protocols, Methods in Molecular Biology. V. 58 / Harwood A.J. (editor). New Jersey: Humana Press, Totowa, 1994. P. 3-7.

4. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids // J. Clin. Microbiol. 1990. V. 28. P. 495-503.

5. Coombs L.M., Pigott D., Proctor A., et al. Simultaneous Isolation of DNA, RNA and Antigenic Protein Exhibiting Kinase Activity from Small Tumour Samples Using Guanidine Isothiocyanate // Anal. Biochem. 1990. V. 188. P. 338-343.

6. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

7. Satokari R.M., Kataja K., Soderlund H. Multiplexed Quantification of Bacterial 16S rRNA by Solution Hybridization with Oligonucleotide Probes and Affinity Capture // Microb. Ecol. 2005. V. 50. P. 120-127.

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО СТРЕПТОКОККОЗУ ТЕЛЯТ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Красочко П.А., д.в.н., д.б.н., профессор УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» г. Витебск, Республика Беларусь

Яромчик Я.П., к.в.н., доцент УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» г. Витебск, Республика Беларусь

Борисовец Д.С., к.в.н., доцент РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вашелеского, г. Минск, Республика Беларусь

Кашко Л.С., к.в.н., доцент ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА, г. Смоленск, Россия

Мисник А.М., ассистент УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» г. Витебск, Республика Беларусь

Толяронок Г.Е., к.в.н., доцент РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вашелеского, г. Минск, Республика Беларусь

Панаськов М.А., аспирант УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» г. Витебск, Республика Беларусь

Аннотация. Факторные болезни молодняка крупного рогатого скота причиняют значительный экономический ущерб животноводческой отрасли Республики Беларусь. Используемые для специфической профилактики