С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған **«Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру»** атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының **материалдары** = **Материалы** Республиканской научно-теоретической конференции **«Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее»**, посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - **2017. - Т.I, Ч.2. -** С.18-21

ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ИЗ КУЛЬТУРЫ ЛЕПТОСПИР

Ермагамбетова С.Е. *–к.в.н., профессор*
Киркимбаева Ж.С. *– д.в.н., профессор*
Нургожаева Г.М. *- к.в.н.*
Казахский национальный аграрный университет, г.Алматы

Введение. Создание стабильного благополучия территории Республики Казахстан по инфекционным болезням и обеспечение биологической безопасности является важной задачей для улучшения социально-экономической обстановки и укрепления национальной безопасности[1].

Успешная борьба с любым инфекционным заболеванием возможна при правильно разработанном комплексе мероприятий, включающую в себя своевременную и эффективную диагностику, разработку мер по оздоровлению хозяйств специфическую профилактику от различных заболеваний, в том числе от лептоспироза. Лептоспироз является инфекционным заболеванием многих видов животных, птиц и людей. Наши исследования свидетельствует, что в последние годы лептоспироз протекает в бессимптомной форме, а переболевшие животные надолго остаются лептоспироносителями. Клиническая форма болезни с симптомами иктерогемоглобинурии или аборты проявляется у небольшой группы животных. Тогда как инфицированные животные, имеющие антитела, но без клинического проявления болезни, являются основным источником возбудителя инфекции среди здоровых животных и людей. Возникновение заболевания людей лептоспирозом связано с наличием эпизоотических очагов лептоспироза у животных[2, 3].

В нашей республике производственный выпуск диагностических препаратов и тест-систем не налажен, единственно узаконенной на практике остается реакция микроагглютинации и лизиса, недостатком которого является то, что для проведения тестов требуется наличие большого количества набора живых возбудителей лептоспироза, которые нуждаются в постоянной поддержке (пересевы через каждые 7 дней), что небезопасно для лабораторных работников. Кроме того, проведение исследований требует больших трудозатрат, обусловленных необходимостью при первичной диагностике лептоспироза постановки серологических реакций с каждым штаммом[4].

В этом направлении более перспективным является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на амплификации invitro специфических последовательностей ДНК и отличающийся высокой чувствительностью и специфичностью. Преимуществом этого метода является также возможность диагностики заболевания на ранних стадиях развития, в инкубационном периоде и при течении в скрытой, нетипичной форме [5].

Разработка тест-системы, позволяющей выявлять ДНК всех патогенных лептоспир вида *L.interrogans*, будет основанием для проведения испытаний не только в клинической, но и в ветеринарной практике, в том числе для прижизненного контроля животных на лептоспироносительство и для индикации лептоспир в продуктах животного происхождения.

Целью и задачей исследования явилось разработка тест-системы, позволяющей выявлять ДНК всех патогенных лептоспир вида L.interrogans

Материалы и методы. Объектом исследования явились 8 штаммов лептоспир (L. pomona, L. tarassovi, L. grippotyphosa, L. hebdomonas, L .serjoe, L. canicola, L. icterohaemorrhagiae, L. australis) для использования их для идентификации возбудителей инфекционных болезней на основе выявления их генетического материала в пробах. Штаммы депонированы в Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (РГП КН МО и Н РК).

Морфологические свойства лептоспир изучались путем микроскопирования препаратов “раздавленная капля” в темном поле микроскопа. Для этого нами использованы современные микроскопы LevenchukMT 42002 с темнопольным фильтром для конденсора, Levenchuk Д870Т, микроскоп LEICA DM 4000 B.

В качестве биологической модели для очистки культур лептоспир использовались морские свинки, которым внутрибрюшинно вводили контаминирующую культуру. Затем кровь из сердца зараженных животных засевали на жидкие питательные среды.

Результаты и обсуждение. При диагностике лептоспироза животных методом ПЦР основным рабочим материалом является ДНК бактерий. Основным критерием в методах выделения ДНК является высокая степень очистки нуклеиновой кислоты от примесей клеточных ДНК и белков. Выделенная геномная ДНК должна быть нефрагментированной, так как она служит матрицей для синтеза специфического продукта [3,4]. Поэтому, нами проведены исследования по отработке оптимальных методов экстрагирования бактериальной ДНК.

Процедура выделения ДНК из клеток и тканей часто является исходным (основным) этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне. От ДНК напрямую или через белки-ферменты зависят все биосинтезы и катаболизм клетки. Клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а хромосомную ДНК очистить от других клеточных

компонентов. Прежде всего, нужно отделить ДНК от белков, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов хроматина. При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и максимально сохранить её целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются[5].

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы:

1) лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом);

2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа;

3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл. Затем ДНК осаждают из раствора этанолом и после центрифугирования растворяют осадок в буферном растворе. Вместе с ДНК частично выделяется и РНК, от которой избавляются с помощью фермента РНКазы.

-В работе использовали музейные штаммы лептоспир, из «исторической» коллекции лаборатории противобактериозной биотехнологии: L.pomona, L.icterohaemorrhagiae, L.tarassovi, L.canicola, L.hebdomadis, L.australlis, L.grippotyphosa. Лептоспиры культировали в водно-сывороточной среде, при температуре 28°С.

-Для выбора оптимального варианта в работе использовали несколько методов выделения ДНК:

-Выделение ДНКс помощью лизостафина.

-Выделение ДНК с помощью сорбентов;

-Способ выделения ДНК основанный на использовании буферных растворов, содержащих высокие концентрации солей-хаотропов типа гуанидинтиоцианата

-Выделение ДНК из культуры лептоспир с помощью автоматической станции выделения нуклеиновых кислот - ThermoScientificKingFisher.

-Выделение ДНК из бактериальной культуры лептоспир проводили обработкой протеолитическим ферментом – протеиназой К.

-Выделение ДНК из клеток лептоспирс помощью тритона Х-100, разработанную сотрудниками лаборатории протвобактериозной биотехнологии КазНАУ.

Главными критериями при отработке оптимальных методов были концентрация и чистота препарата.

После выделения ДНК из клеток лептоспир вышеперечисленными методами проводили качественный и количественный анализ образца. Электрофорез проводили в 0,8 % агарозном геле в ТАЕ-буфере. Спектрофотометрически измеряли отношение между оптическими плотностями при 260 и 280 нм. Максимум поглощения для нуклеиновых кислот регистрируется при длине волны 260 нм. Препарат ДНК считается свободным от примесей при величине отношений $E_{260/280}$ равным 1,8 и выше. Если этот показатель ниже указанного, то образец загрязнен белками или фенолом.

Образцы ДНК из клеток лептоспир, полученные с использованием детергентов лизостафина и сорбента, оказались невысокого качества. Отношения между оптической плотностью при длине волн 260 и 280 нм в среднем составляли 1,65-1,7, это указывает на загрязненность ДНК белком и другими примесями.

Лучшие результаты были получены при обработке бактериосодержащей суспензии детергентом – 10 % раствором додецилсульфата натрия в сочетании с протеиназой К и с последующей экстракцией фенол/хлороформом. Применение додецилсульфата натрия не только депротеинизирует бактериальную клетку, но также подавляет активность нуклеаз. Клеточные белки удаляли путем обработки протеолитическим ферментом – протеиназой К. Для удаления белков и разрыва связей ДНК-белок использовали смесь фенол-хлороформ, который является более сильным средством депротеинизации. Отношение оптической плотности (E_{260}/E_{280}) полученных препаратов ДНК лептоспир имело среднее значение 1,820 ±02.

Хорошие результаты дают использование автоматической станции выделения НК - ThermoScientificKingFisher. Отношение оптической плотности (E260/E280) полученных препаратов ДНК лептоспир имело среднее значение 1,75 ±0,05.

Лучшие результаты были получены при использовании метода выделения ДНК из клеток лептоспир с помощью тритона Х-100. Отношение оптической плотности (E260/E280) полученных препаратов ДНК Leptospirainterrogans имело среднее значение1,91±0,03 (п=4).

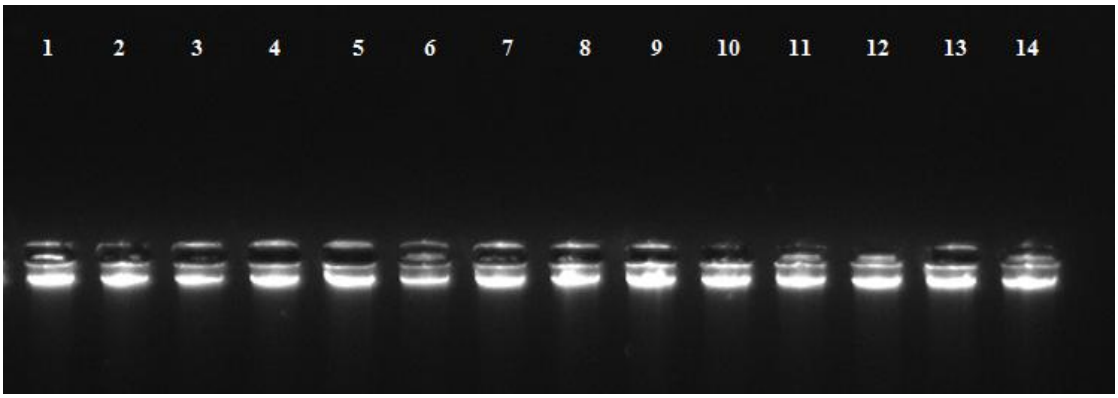

Рисунок 1 Образцы ДНК, выделенные из разных штаммов лептоспир.

Дорожки с 1 по 7 - ДНК лептоспир выделенные набором: Thermo Scientific King Fisher, с 8- по 14 - ДНК из клеток лептоспир выделенные с помощью тритона Х-100, разработанные сотрудниками лаборатории противобактериозной биотехнологии КазНАУ.

Выводы. Результаты качественного и количественного анализа показали, что при выделении ДНК из клеток лептоспир хорошие результаты дают использование автоматической станции выделения НК – ThermoScientificKingFisher, метод обработки бактериосодержащей суспензии детергентом – 10 % раствором додецилсульфата натрия в

сочетании с протеиназой К, а также метод выделение ДНК из клеток лептоспир с помощью тритона Х-100. Способы позволяют получить высокоочищенную хромосомную ДНК из клеток лептоспир в препаративном количестве пригодный для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) и для клонирования.

Список литературы

1. Малахов Ю.А., Панин А.Н., Соболева Г.Л. Лептоспироз сельскохозяйственных животных. - Москва, 2000. – 420 с.

2.VijayachariP., SugunanA.P.ShriramA.N. Leptospirosis: an emerging global public health problem //Web of Science. J. Biosciense. -2008. 33(4), 557–569.

3. Киркимбаева Ж.С. Иммунопрофилактика лептоспироза сельскохозяйствен-ных животных и пушных зверей: автореф. дисс. докт. вет. наук. –Алматы. -2004. -45с.

4.Hernandez-Rodriguez P., C. A. Diaz, E. A. Dalmau, G. M. Quintero. 2011, A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. J Microbiol Met., 2011,84:1-7.

5.Павленко А.Л. Особенности эпидемиологии лептоспироза на современном этапе // Симферополь, Запорожский медицинский журнал.- 2013. №6. С. 63-69.