

**«Сейфуллин оқулары-14: Жастар, ғылым, инновациялар: цифрландыру – жаңа даму кезеңі»** атты Республикалық ғылыми-теориялық = **Материалы** Республиканской научно-теоретической конференции **«Сейфуллинские чтения-14: Молодежь, наука, инновации: цифровизация – новый этап развития».** - 2018.- Т.І, Ч.2. - С. 148-151.

## **ПОЛИМЕРАЗДЫ ТІЗБЕКТІ РЕАКЦИЯ ӘДІСІ АРҚЫЛЫ СІБІР ЖАРАСЫ ҚОЗДЫРҒЫШЫН БАЛАУ**

*Әбенова Ә.Ж., 2 – курс магистранты*

Мақалада молекулярлық биологияның қазіргі заманғы әдістерінің бірі - ПТР балау әдісі сипатталған (полимеразды тізбекті реакция). ПТР диагностика көптеген ауруларды анықтау үшін қазіргі заманға сай жылдам және нақты әдіс болып табылады. ПТР диагностика жұқпалы аурулар қоздырғышын басқа әдістермен (иммунологиялық, бактериологиялық, микроскопиялық) анықтау мүмкін болмаған жағдайда қолданылады.

ПТР диагностика 3 негізгі процедурадан тұрады: зерттелетін материалды дайындау, бұл кезде қоздырғыш ДНК-н немесе РНК-н бөліп алу процесі жүреді, полимеразды тізбектік реакцияның өзінен және ПТР өнімін бөліп алу (детекция).

Бұл кезде қоздырғыштың генетикалық материалы ДНК-полимераза ферментінің әсерінен бірнеше рет көбейіп, ДНК фрагменттерінің көшірмелері тіркеледі. Бұл ПТР диагностика кезінде тіпті бактерия немесе вирустардың бірен-саран жасушаларын немесе кейбір қиын жағдайларда, мысалы, антигендік өзгергіштігі өте жоғары немесе жасуша ішінде тіршілік ететін қоздырғыштар да анықталады.

Зерттеу ұзақ уақытты қажет етпейді. Қазіргі жаңа технологияның дамыған кезеңінде қоздырғышты бөліп алу және өсіру, одан нуклеин қышқылын бөліп алу үрдістері толығымен стандартталған және автоматтандырылған. Әдістің автоматизациялығы қолмен жүргізілетін зерттеу кезінде кездесетін мүмкін қателіктерді азайтады. Нәтиже бірнеше сағаттың ішінде алынуы мүмкін.

*Зертханалық балау* заманауи медицинаның ажырамас бөлігі болып табылады, онсыз толыққанды кез келген ауруды балауды жүргізу мүмкін емес. Қазіргі уақытта «ескі» диагностикалық әдістерді үнемі жетілдіріп отырады, жаңа, барынша тиімді және сенімді әдістер жасап шығарылуда.

Сібір жарасын зертханалық балау әдістері бүгінгі күні өте жетілген және балау әдістерінің саны көбейуде. Балау әдістерінің жетілуінің және көбеюінің басты өзектілігі - нақты диагноз қою және аурудың аурудың алдын алуда маңызды болып табылады.

Дәстүрлі морфологиялық, иммунологиялық және биохимиялық әдістермен қатар, зертханалық қызмет мамандары дәлірек нәтижелерге қол жеткізу үшін сібір жарасын балауда жаңа технологияларды қолданады.

Молекулярлық биологияның ең заманауи әдістерінің бірі - ПТР балау әдісі болып табылады (қате ықтималы 5% артық емес). ПТР тесті әдеттегі

әдістермен салыстырғанда бірқатар артықшылықтарға ие, өйткені бұл әдіс сынау үлгісінде патогенді аурудың ДНҚ бөлігін жүздеген есе үлкейтіп көруге мүмкіндік береді. Әдістің сезімталдығы иммунохимиялық және микробиологиялық әдістерге қарағанда әлдеқайда жоғары, ал әдіс принципі маңызды антигендік өзгермелілігі бар инфекциялардың болуын диагностикалауға мүмкіндік береді.

Теориялық тұрғыдан алғанда, ПТР әдісі үлгідегі өзге ДНҚ-ның бір данасын анықтайды, бұл оның сезімталдық шегі жоқ екенін айтуға мүмкіндік береді. ПТР әдісі патогендердің болуын анықтайды, тіпті үлгілерде патогеннің бірнеше ДНҚ молекуласы ғана бар болса да.

ПТР сынақтарын өткізу үшін пайдаланылатын материал мынадай: ПТР зерттеу үшін микробиота / микроэтопат (пункат) 0,1-0,2 мл 0,1, N 1 натрий хлориді немесе көлік ортасының 9% ерітіндісі.

Материалдар. Праймерлердің әсерлілігін, сезімталдығын және спецификалық қасиеттерін, сондай-ақ эксперименттік ПТР-ді сынау үшін *B. anthracis*-тің вирулентті және вакциналық штамдарын қолдандық, сондай-ақ гетерогенді микроорганизмдердің штамдары пайдаланылды (1-кесте). ДНҚ шығару әдістері коммерциялық ДНҚ-сорбциялық-В жинақтары (AmpliSens, Ресей) және QIAampDNAMiniKit (Promega, АҚШ) арқылы жүргізілді.

ДНҚ концентрациясы өлшенді. Препараттың *B. anthracis* геномына ерекшелігі және басқа бактериялармен өзара реакция болмауы тексерілді. Праймерлер стандартты фосфоамид әдісімен синтезделіп, қоспалардан тазартылып, вакуумды концентраторға шоғырланды. Праймерлік ерітінділер жұмыс концентрациясына дейін сұйылтылып, ПТР-мен спецификалық және сезгіштікке сыналды.

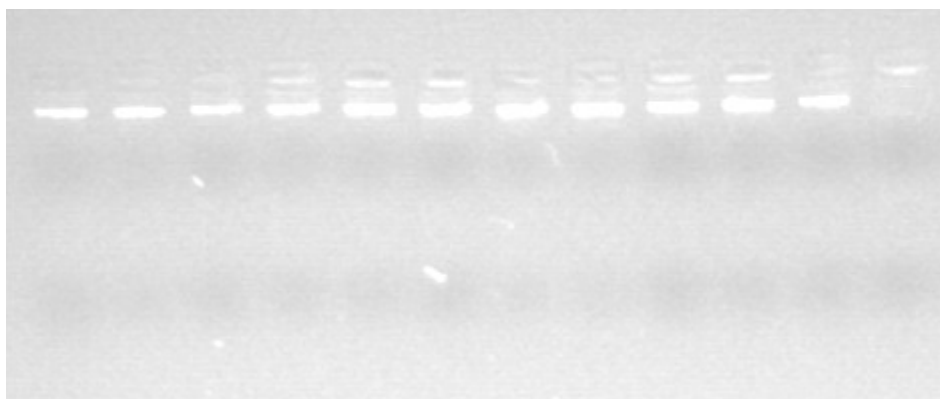
Полимеразды тізбекті реакция «Терзик» термоциклоператорларында («ДНҚ-технология» НПО, Ресей) жүргізілді. ПТР нәтижелері 1,2% агароздық гелде амплификациалық өнімдердің электрофорезі арқылы әзірленген праймерлер мен эксперименттік сынақ жүйесін пайдалана отырып есептелді. Фрагменттердің мөлшері молекулалық салмақ маркерлерімен анықталды.

1-кесте - ПТР сынау жүйесінде пайдаланылатын материалдар тізімі

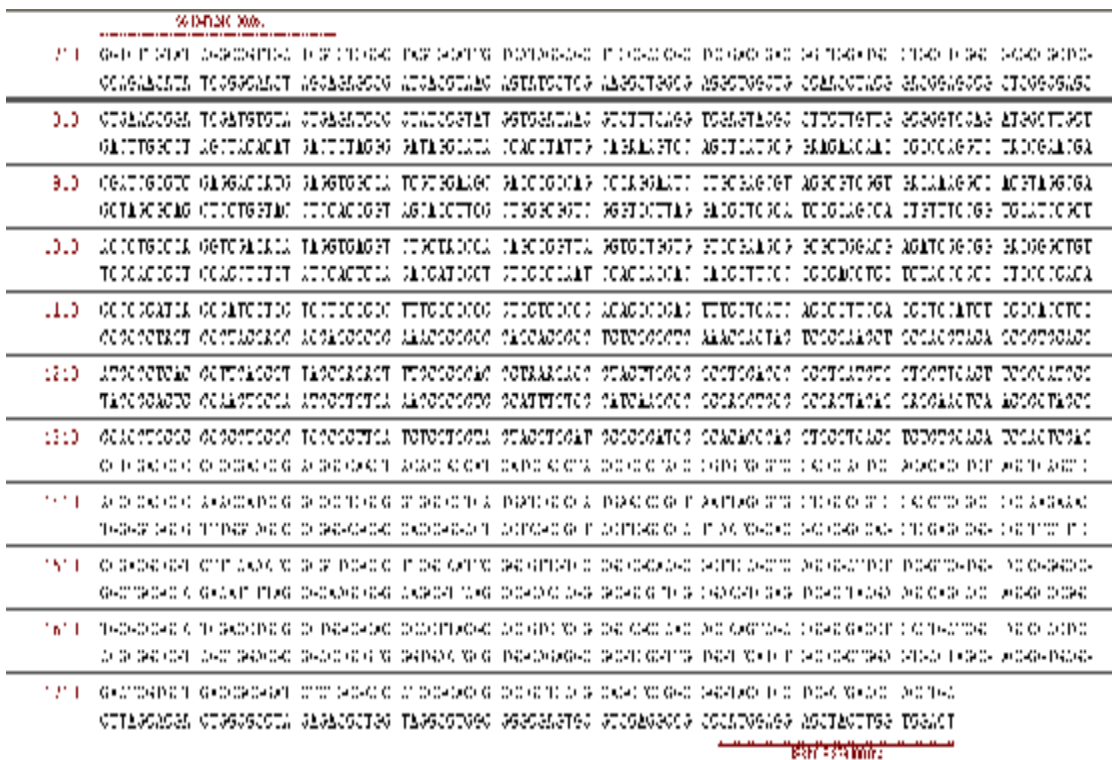
Сынама түрі	Сипаттамасы
Штаммы, полученные из музея живых культур	1 штам <i>B. anthracis</i> , 1 штам <i>B. cereus</i> , Ценковскийдің вакцина штаммы, ЖЖБИ вакцина штамдары алынған;
Қоршаған орта объектілері	Ірі қара мал сою алаңынан 3 топырақ үлгілері

Зерттеу жұмысы. *B. anthracis*. ДНҚ жинағының амплификация программалары жасақталды. Ол 42 циклден тұрады. 1-ші этап «денатурация» 95оС бойы 3 минут, 2-ші этап «отжиг» 63оС-та 1 минут бойы және 3-ші этап «элонгация» не «синтез» 1-ші минуттан бастап 72 оС-та. Реакция қосындысы мына компоненттерден тұрады: праймерлер 0,1 мкл, ПТР реакциясын

жүргізуге арналған буфер 2,0 мкл, Mg Cl 1,5 М 1,2 мкл, dNTP дизоксинуклеотидтрифосфат қосындысы 0,4 мкл. Полимеразды тізбекті реакциясының жағдайларын оптимизациялауды қолдағы бар әдебиеттердегі деректерді ескере отырып өткіздік. Әдебиеттердегі барлық материалдарды өңдеп, сібір жарасы ауруының қоздырғышын анықтайтын екі жұп праймер таңдалып алынды. Vector NTI программа пакетінің көмегімен компьютер анализінің негізінде екі жұп праймер таңдалды. Анализ нәтижесінде *V.anthraxis* ерекше екі жұп праймер таңдалды IS6110-F239 (T C A G G T G G T T C A T C G A G G A G G T A C) және IS6110- R 240 (G G T C T T G T A T A G G C C G T T G A T C G T).



1 – сурет. ДНК препараттарынан алынған агарозы гелдегі электрофорез



2 – сурет. Микобактерияларды анықтауға арналған компьютермен өңделген екі жұп праймерлер

Зерттеу нәтижесі. Сібір жарасы изоляттарынан бөлінген ДНК үлгілерін ПТР әдісімен зерттеуді моделі iQ 5 Bio Rad фирмасының амплификаторында жүргізілді. Амплификация программасы 42 циклден тұрады. 1-ші этап «денатурация» 95оС бойы 3 минут, 2-ші этап «отжиг» 63оС-та 1 минут бойы және 3-ші этап «элонгация» не «синтез» 1-ші минуттан бастап 72 оС-та.

Оптимизацияланған реакциялық ерітіндіге біз 1мкл ДНК қостық. Бұл ДНК бактериологиялық культураларынанегізделе жасақталған коллекциядан алынды.

Сайып келгенде ПТР продуктілерін электрофорез әдісімен зерттегенде агароздыгельде анық жолақтар байқалды. Бұл ПТР нәтижелерінің оң болғанын көрсетеді.

*Нәтижелермен талдау.* Қазақстандағы сібір жарасын балау үшін қолданылатын әдістерді талдай келе, ПТР әдісі жылдамдығы, нәтижелілігі және сенімділігі жағынан тиімді болып табылады.

Қорытынды. Осылайша, сібір жарасы жағдайы туындағанда ауруға қарсы шараларды уақтылы жүргізу үшін, жылдам және сенімді зертханалық балау әдісін жүргізу қажет.

ПТР әдісі қысқа уақыт кезеңінде (5-7 сағат) бір клеткаларды анықтайды және ООИ классикалық диагностикалық әдістерімен салыстырғанда, генодиагностика амплификационды технологияларды қолдана отырып, жоғары сезімталдықпен ерекшеленеді.

ПТР микроорганизмдердің вегетативтік және споралы нысандарының ДНК-сын биологиялық материалдар мен сыртқы ортадағы объектілерден де анықтауға мүмкіндік береді.

#### Пайдаланылған әдебиеттер тізімі

1 Молекулярно-генетические методы в лабораторной диагностике сибирской язвы материалы научных конференции//. [Текст]: - Лухнова Л.Ю., Пазылов Е.К., Мека-Меченко Т.В., Соломадин М.В., У.А. Избанова У.А., Некрасова Л.Е., Сармантаева А.Б /Алматы, 2013.- 39 с.

2 Turnbull, P.C.V., et al. Serology and anthrax in humans, livestock and Etosha National Park wildlife. Epidemiol Infect. Turnbull P.C.V. [Текст]: Doganay M., Lindeque P.M.1992; 108:299-313.

3. Николайчук, Л.Ф. Индикация спор возбудителя сибирской язвы в объектах внешней среды и кормах иммуноферментным методом./В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных. [Текст]: Николайчук Л.Ф., Вишняков И.Ф., Бакулов И.А., Котляров В.М., Бударкова Э.Л Покров.1998.-с.329-330.

4 Пальцев, М.А. Молекулярная медицина и прогресс фундаментальных наук// [Текст]: Вестник РАН. 2003, т.73, №2, с.99-109.

5 C.P.Quinn, et al. Specific, sensitive, and quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for human immunoglobulin G antibodies to Anthrax toxin protective antigen. Emerg. Infect. Dis., [Текст]: C.P.Quinn. V.A.Semenova, Ch.M.Elise 2002, v.8, n.10, p.1103-1111.

6 K.S.R.Sastry, U.Tuteja, P.K.Santhosh et al. Identification of Bacillus anthracis by a sample protective antigen-specific mAb dot-ELISA. [Текст]: J.Med.Microbiol. K.S.R.Sastry, U.Tuteja, P.K.Santhosh,2003,v.52,p.47-49.

7 Detection of frequency resonance energy transfer pair on double-labeled microsphere and Bacillus anthracis spores by flow cytometry.Appl.Environ.Microbiol. [Текст]: Zahavy E, Fisher M, Bromberg A, Olshevsky U.,2003,v.69,n.4,p.2330-9.

*Научный руководитель:  
Кандидат ветеринарных наук,  
доцент кафедры ветеринарных наук  
Байкадамова Г.А.*