

**МЕТОДИКА ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ
С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SYBRGREEN I**

Кузнецова А.А.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону,
e-mail: anna.kuz-2011@yandex.ru

В настоящее время наиболее популярной среди всех молекулярно-диагностических методик, используемых для детекции, становится ПЦР с учетом результатов в реальном времени. Это объясняется высокой чувствительностью, специфичностью реакции, оперативностью получения ответа, отсутствием возможности загрязнения ампликонами и возможностью проводить количественное определение исследуемой ДНК в пробе.

Типы ПЦР в реальном времени различаются по способам генерации репортерной флуоресценции. Существует два основных направления, которые используются в настоящее время:

1. Применение интеркалирующих флуоресцентных агентов, флуоресценция которых значительно возрастает при связывании с двуцепочечной ДНК (SYBR Green).
2. Использование меченых флуоресцентными агентами олигонуклеотидных проб, комплементарных участку PCR-продукта (TaqMan, Molecular Beacons и LightCycler) [1, 4-11].

При внесении в реакционную смесь SybrGreen I происходит внедрение этого красителя в двуцепочечную ДНК, амплифицируемую в процессе реакции, что позволяет учитывать возникающее при этом внедрение флуоресцентное свечение. Чем больше ДНК синтезируется в реакции, тем более интенсивный сигнал детектируется прибором.

Из всех перечисленных методик самой простой, доступной для любых лабораторий, имеющих соответствующую приборную базу, и экономически выгодной является методика с использованием интеркалирующих красителей.

Но, не смотря на то, что использование SYBR Green I чрезвычайно удобно и экономически выгодно, этот метод обладает рядом недостатков:

1. Высокие требования к специфичности реакции – любая двуцепочечная ДНК будет генерировать репортерную флуоресценцию.
2. Невозможность работать больше, чем с одной ПЦР-реакцией в одной реакционной смеси.
3. Меньшая точность при малых количествах субстрата.

Влияние неспецифических продуктов реакции на уровень детекции флуоресцентного свечения контролировали с помощью проверки специфичности при электрофоретическом разделении продуктов амплификации. Использование праймеров vlm12 показало, что в ПЦР с ДНК возбудителя чумы не образуются неспецифические фрагменты ДНК [12, 3]. При неизвестной пробе постановка контрольного электрофореза должна происходить всегда.

Данная методика предназначена только для одной ПЦР – реакции в реакционной смеси, поэтому нет необходимости учитывать второй недостаток.

По поводу третьего недостатка можно сказать, что тестирование диагностической системы показало, что точность определения количества микробных клеток падает при их концентрации ниже 10000 мкл в мл, однако, удачно, с нашей точки зрения, подобранные условия реакции позволяют и при концентрации ниже этих значений уверенно определять ориентировочное количество микробных клеток на амплификаторе «ДТ322» с возможностью автоматического программирования (ДНК Технология, Россия).

Методика выполнения полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителей *Yersinia pestis* в ПЦР с учетом результатов в реальном времени и с использованием SYBRGreen I и праймеров vlm12 состоит из трех этапов:

Первый – выделение ДНК из исследуемых проб [2]. Вторым этапом идет подготовка контрольной панели ДНК (Калибровочная панель изготавливалась из разведений содержащих 10^9 , 10^7 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 мк/мл двухсуточной культуры штамма *Y.pestis* EV76(НИИЭГ). Каждую пробу после выделения ДНК разводили 50 мкл ТЕ буфера и в реакцию вносили по 5 мкл материала. Таким образом, в пробирках, в которых проходила реакция, ориентировочно содержалось эквивалентное количество ДНК из $3 \cdot 10^7$, $3 \cdot 10^5$, 3000, 300, 30, 3 мк соответственно).

Третий этап собственно постановка ПЦР. Реакцию с выделенной ДНК проводят, руководствуясь стандартным протоколом. ПЦР с учетом результатов в реальном времени проводили в режиме автоматической амплификации на приборе ДТ-322 «ДНК-технология» (Москва), используя комплекты реагентов для ПЦР-PB (ОАО «Синтол», Москва). Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Дополнительными компонентами служили: для ПЦР-PB SYBRGreen I – интеркалирующий краситель в концентрации 9 мкг/мкл.

Полученные результаты оцениваются как положительные при наличии сигнала, регистрируемого прибором по каналу регистрации длины волны 520 nm и сравнения уровня этого сигнала с сигналом от положительной и отрицательной пробы. Расчет ориентировочного значения примерной концентраций ДНК в пробе проводится с помощью сравнения кривых флуоресценции пробы и панели, контрольных образцов. Контроль специфичности ПЦР реакции проводится методом электрофоретического разделения полученных в тесте амплификатов. При наличии неспецифических фрагментов ДНК в пробе, отличающихся по молекулярной массе от специфического фрагмента – 390 п.н. результаты ПЦР невозможно считать корректными.

Список литературы

1. Куклев В.Е., Яшечкин Ю.И., Осина Н.А. // Мол диагностика. – М., 2010. – Т. 1, Раздел 6. – С. 395-397;
2. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности: методические указания. – М., 2003. – МУ 1.3.1794-03.
3. Трухачёв А.Л., Иванова В.С., Арсеньева Т.Е. и др. // Клинич. лабораторная диагностика. – М., 2008. – №12. – С. 49-52.
4. Amoako K.K., Goji N., Macmillan T. et al. // J Food Prot. – 2010 Jan. – №73(1). – P. 18-25.
5. Gabitzsch E.S., Vera-Tudela R., Eisen R.J. et al. // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2008. – №79(1). – P. 99-101.
6. He J., Kraft A.J., Fan J., Van Dyke M. et al. // Viruses. – 2009. – №1. – P. 441-459; doi:10.3390/v1030441.
7. Li W., Hai R., Yu D.Z. et al. // Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. – 2005.
8. Matero P., Pasanen T., Laukkanen R. et al. // APMIS. – 2009 Jan. – №117(1). – P. 34-44.
9. Qu S., Shi Q., Zhou L., Guo Z. et al. // PLoS ONE, www.plosone.org March 2010. – Vol. 4, Issue 3. – e629.
10. Riehm J.M., Rahalison L., Scholz H.C. et al. // Mol Cell Probes. – 2011 Feb. – №25(1). – P. 8-12. Epub 2010 Oct 8.
11. Tran T-N-N., Signoli M., Fozzati L. et al. // PLoS ONE, www.plosone.org March 2011. – Vol. 6, Issue 3. – e16735.
12. Trukhachev A.L., Morozova I.V., Arsenjeva T.E. и др. // Medical corps. – 2009. – Vol. 4. – P. 29-30 Abstracts Medical Biodefense Conference 2009, Munich, Germany.

**РЕГРЕССИОННЫЕ МОДЕЛИ ПРОДУКЦИИ
ОЗЕРНОГО ФИТОПЛАНКОНА**

Кузьмина А.И.

Государственная полярная академия, Санкт-Петербург,
e-mail: Anna.kuzmina.spb@gmail.com

Одной из важнейших характеристик озерных экосистем (как и любых других) является первичная продукция. Существенную роль в образовании пер-