

4. Надосадочную жидкость перенести в новые пробирки.
5. Добавить по 25 мкл сорбента, тщательно перемешать на вортексе, инкубировать 10 минут при комнатной температуре периодически встряхивая на вортексе.
6. Центрифугировать пробирки при 12000 x g в течение 30 секунд.
7. Удалить надосадочную жидкость, добавить по 500 мкл отмывочного раствора. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе.
8. Центрифугировать пробирки при 12000 x g в течении 30 секунд.
9. Повторить п. 7-8.
10. Удалить надосадочную жидкость, добавить по 500 мкл раствора для финальной отмывки. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе.
11. Центрифугировать пробирки при 12000 x g в течении 30 секунд.
12. Удалить надосадочную жидкость, инкубировать пробирки в твердотельном термостате с открытыми крышками при температуре 65°C в до подсушивания сорбента (5-10 минут).
13. Добавить по 50 мкл ТЕ-буфера, тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе.
14. Инкубировать пробирки в твердотельном термостате при температуре 65°C в течении 10 минут периодически встряхивая на вортексе.
15. Центрифугировать пробирки при 12000 x g в течение 60 секунд. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК и готова для анализа в ПЦР.

Следует отметить, что особое внимание необходимо уделять подготовке материала к исследованию. Тщательно проведенная гомогенизация значительно увеличивает финальный выход ДНК.

Таким образом, нами был разработан экспресс-метод экстракции ДНК из тканей растительного происхождения, позволяющий эффективно и быстро выделять материал для исследований в ПЦР.

Выводы.

1. Разработан протокол экстракции ДНК из тканей растительного происхождения, включающий лизис клеток бромистым цетилтриметиламмонием, сорбцию ДНК на диоксид кремния, двукратную отмывку сорбента 70 % этанолом, финальную отмывку раствором, содержащим хлороформ, и элюцию ДНК в раствор с низкой ионной силой.

2. Эффективность использования данного протокола подтверждена путем постановки ПЦР с праймерами pos Term f и pos Term g, фланкирующими участок длиной 118 пар нуклеотидов NOS терминатора с ДНК экстрагированной из соевого экстракта, комбикорма, сои и кукурузы.

Список литературы

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология [Текст] / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
2. Игнатъев, И. Генетически модифицированные организмы и обеспечение биологической безопасности [Текст] / Игнатъев И., Тромбицкий И., Лозан А. – Кишинев.: Экоспектр-Бендеры, 2007. – 60 с.
3. Terrorist Threats to Foods. Guidance for Establishing and Strengthening Prevention and Response Systems: In the "Food safety issues" series, Food Safety Department, World Health Organization, Geneva. – 2002. – 45 p.
4. ISO 21570:2005 provides the overall framework of quantitative methods for the detection of genetically modified organisms (GMO) in foodstuffs, using the polymerase chain reaction (PCR).
5. DNA Extraction From Plants: The Use of Pectinase [Text] / H. Steven [at al] // Plant Molecular Biology Reporter. – 2001. – №19. – P. 353-359.
6. Rogstad, Steven H. DNA Plant DNA Extraction Using Silica [Text] / Steven H. Rogstad // Plant Molecular Biology Reporter. – 2003. – №21. – P. 463a-463g.

DEVELOPMENT OF A RAPID-EXTRACTION METHOD OF DNA FROM MATERIAL OF PLANT ORIGIN FOR GENETIC ANALYSIS IN THE PCR

Solodyankin A.S., Sapko, S.A., Gerilovych A.P.

National Science Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkov

The article presents the results of express-method development for DNA extraction from plant material for genetic analysis by PCR-based cell lysis cetyltrimethylammonium bromide with further sorption of DNA on silicon dioxide. The results confirm the efficacy of this technique.

УДК 591.555.3:591.57

ОДЕРЖАННЯ АНТИГЕНУ ДЛЯ КОНТРОЛЮВАННЯ АДЕНОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ КУРЕЙ ПЕРШОГО СЕРОТИПУ НА ОСНОВІ ІФА

Стегній Б.Т., Антонов В.С., Руденко О.П., Коваленко Л.В., Михайлова С.А., Ткаченко С.В., Усова Л.П.

ННЦ «ІЕКВМ», м. Харків

Семенченко О.Ю.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

У зв'язку з поширенням інфекційних хвороб тварин питання біологічної безпеки є важливою складовою національної безпеки нашої держави. Істотне місце в системі біологічної безпеки займає наукове забезпечення протиепізоотичних заходів, однією зі складових якого є розробка і впровадження діагностиків на основі ІФА. Метою наших досліджень було отримати компоненти для тест-системи щодо визначення антитіл до авіадемовірусу першого серотипу.

Авіадемовірусна інфекція курей першого серотипу (ААВІК) — інфекційне захворювання переважно курчат, що характеризується розладами органів респіраторної та травної систем, ураженням серцево-судинної системи, органів яйцеутворення [1]. У промисловому птахівництві досить часто аденовіруси, зокрема ААВІК, виступають у ролі вторинного фактору при інших інфекційних захворюваннях. Завдяки вертикальній передачі, авіадемовіруси контамінують курячі ембріони, що є перешкодою для використання цих ембріонів з метою репродукції інших вірусів.

Розділ 9. Біотехнологія

Збудник захворювання — вірус, який відносять до родини Adenoviridae роду *Aviadenovirus*. Вірус AABIK є стійким до нагрівання, дії ефіру, хлороформу, сапоніну та дезоксихолату натрію. Також він зберігає життєздатність при коливаннях рівня рН середовища від 5,0 до 9,0. Вірус резистентний до дії 0,25 %-го водного розчину трипсину, 2%-го водного розчину фенолу та 50 %-го водного розчину етилового спирту. Вірус втрачає свою патогенність під дією абсолютного етанолу та при нагріванні протягом 30 хвилин за температури 60°C. Інактивується вірус також розчинами алкілюючого типу: формальдегідом, β-пропіолактоном, гідроксиламіном та похідними етиленіміну [2, 3].

Джерелом інфекції є хвора та перехворіла на AABIK птиця. Головним шляхом передачі збудника є трансваріальний (через інкубаційне яйце), а також з продуктами забою хворої птиці, інфікованими кормами, водою та одягом обслуговуючого персоналу. Качки, індки, цесарки, фазани, голуби, перепели та гуси можуть бути носіями патогенного вірусу.

Діагноз на AABIK встановлюють комплексно на підставі епізоотологічних даних, клінічної картини, патологоанатомічних змін та результатів лабораторних досліджень. Серологічна діагностика авіааденовірусної інфекції основана на виявленні в сироватці крові хворої або перехворілої птиці специфічних антитіл до збудника інфекції та визначення їх титру. Для цього широко застосовують реакцію дифузійної преципітації, реакцію імунофлуоресценції, реакцію зв'язування комплекменту та імуноферментний аналіз (ІФА), які мають змогу виявити антитіла до групспецифічного антигену. Типоспецифічні антитіла виявляють за допомогою реакції нейтралізації, але також можна виявити і в ІФА [4]. Для проведення імуноферментного аналізу необхідно одержати високоочищений антиген. Одним із методів, який дає можливість отримати очищений та концентрований вірусний антиген, є високошвидкісне центрифугування.

Метою наших досліджень було розробити найбільш ефективний метод центрифугування вірусмісного матеріалу при порівнянні двох методів: високошвидкісного центрифугування через «подушку» 30 % сахарози і через градієнт сахарози та хлориду цезію.

Матеріали та методи. В якості вихідного матеріалу використовували штам CEL0 авіааденовірусу першого серотипу, вирощеного на курячих ембріонах. Антигени віріонів видаляли із алантоїсної рідини.

Роботу проводили за допомогою наступного обладнання: ультрацентрифуги MSE Superspeed 65 (Англія), ультрафіолетового оптичного монітору (LKB 2238 Uvicord S 2), двоканального потенціометру (LKB 2210), колектору фракцій (LKB 2070 ULTRORAC 2), рідера „SUNRISE”.

Для постановки ІФА були виготовлені діагностичні позитивні сироватки крові курей – до аденовірусу штаму CEL0 і діагностичні негативні сироватки крові курей. Контрольні позитивні сироватки були одержані від вакцинованих курчат. Контрольну негативну сироватку крові було одержано від курчат, вільних від антитіл до аденовірусу, що також перевірено в ІФА.

Для відпрацювання непрямого методу ІФА був виготовлений імунопероксидазний кон'югат проти імуноглобуліну G курей. Для цього із сироватки крові здорових курей була виділена, шляхом внесення ПЕГ-115, загальна фракція імуноглобулінів. Далі на колонці з ДЕАЕ-сефадексом А-50 був виділений Іg класу G. Отриманий препарат використовували для імунізації кролів. Виділення з антисироватки крові кролів імуноглобулінів класу G проводили за допомогою сульфату амонію. Очищення імуноглобуліну проводили за допомогою іонообмінної хроматографії із застосуванням ДЕАЕ сефадексу А-50. Далі імуноглобулін G було кон'юговано з пероксидазою хрому за Nakane [5].

Результати досліджень. Для виготовлення антигену у першому досліді вірусміщуючу рідину піддавали центрифугуванню на центрифугі PC-6 протягом 15 хвилин при 3000 обертів на хвилину (1000 g), за температури 5 °С, концентрували 7 % ПЕГом, очищували ультрацентрифугуванням через 30 % сахарозу протягом 90 хвилин при 25000 обертів на хвилину (76000 xg) за температури 5 °С. Осад вірусного матеріалу ресуспендували у трис-буфері рН 9,2. Концентрація білка в очищеному і сконцентрованому антигені становила 300 мкг/см³. Контроль чистоти і активності антигену проводили в реакції ІФА.

У другому досліді вірусміщуючу рідину спочатку центрифугували на ЦЛР-1 при 2000 обертів на хвилину (630 g) протягом 10 хвилин, за температури 5 °С. Далі супернатант наносили на 30 % розчин сахарози у трис-буфері з рН 7,6 і центрифугували у бакет-роторі ультрацентрифуги MSE Superspeed (6 x 16,5 мл) протягом 60 хвилин при 25000 обертів на хвилину (76000 g) за температури 5 °С. Осад ресуспендували у трис-буфері та нашарували на градієнт: 10 % сахароза – 50 % сахароза з 35 % хлоридом цезію на трис-буфері S 1.042 – 1.488 г/см³. Градієнт центрифугували у бакет-роторі ультрацентрифуги MSE Superspeed (3 x 25 мл) протягом 240 хвилин при 28000 обертів на хвилину (75000 g) за температури 5 °С. Після центрифугування градієнт розділяли в пристрої для фракціонування градієнтів шляхом піддавлення перистальтичним насосом 60 % розчин сахарози на дно пробірки. Градієнт продавлювали через оптичний монітор за довжини хвилі 254 нм. Сигнал з монітору реєструвався самописцем двоканального потенціометру. Паралельно з реєстрацією оптичної щільності потенціометр відмічав кожну фракцію, які збирались по 20 мкл на колекторі. У фракціях за допомогою рефрактометра вимірювали густину. Графік зміни густини градієнта зіставляли з піками оптичного сканування профілю цього градієнта. Значення плавучої щільності вірусу встановлювали на перехресті трендової лінії з піками білків – вона становила в середньому 1,304±0,002 г/см³. Ці фракції були використані в якості антигену для ІФА.

Було відпрацьовано параметри тест-системи для проведення реакції імуноферментного аналізу. Оптимальна концентрація білка, внесеного в лунки антигену, складала 2 мкг/см³. Також встановлено, що час, необхідний для адсорбції антигену на поверхні полістиролу, становив 16-18 годин за температури 4 °С. Для усіх наступних стадій ІФА оптимальний час інкубації 1 година за температури 37 °С. Оптимальною буферною системою для ІФА виявився ФСБ з рН 7,6. У якості блокуючого розчину використовували 1 % розчин БСА. Активність антигенів визначали в імуноферментній реакції з позитивними і негативними до аденовірусу першого серотипу сироватками (табл.1).

Таблиця 1 – Визначення концентрації антигену

	Концентрація антигену											
	2 мкг/мл				5 мкг/мл				10 мкг/мл			
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800
A	1,759	1,678	1,488	1,378	1,857	1,809	1,721	1,677	1,857	1,835	1,785	1,751
B	1,403	1,511	1,302	1,203	1,805	1,800	1,768	1,599	1,861	1,761	1,748	1,669
C	0,443	0,424	0,374	0,309	0,968	0,968	0,981	0,888	1,071	1,045	1,141	1,125
D	0,392	0,367	0,356	0,350	0,848	0,840	0,887	0,859	1,020	0,998	0,999	1,071

Примітки: 1) Лунки АВ 1-12 – позитивні сироватки до аденовірусу першого серотипу; 2) Лунки CD 1-12 – негативні сироватки до аденовірусу першого серотипу.

При відпрацюванні розведення кон'югату було встановлено, що оптична щільність позитивної сироватки з антитілами проти аденовірусу першого серотипу у розведенні 1:400 перевищувала оптичну щільність негативної - у два рази при розведенні кон'югату 1:10000 (табл. 2).

Таблиця 2 – Визначення робочого розведення кон'югату

	Розведення сироваток										Контроль кон'югату	
	1:100		1:200		1:400		1:800		1:1600			
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	11	12
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
A	2,893	3,102	2,860	3,078	2,986	3,072	3,014	3,070	3,050	3,092	3,088	3,100
B	3,105	1,625	2,987	1,716	2,765	1,640	2,467	1,662	2,245	1,723	1,670	1,600
C	2,378	0,944	2,062	0,890	1,883	0,890	1,459	0,877	1,314	0,905	0,905	0,959
D	1,935	0,733	1,862	0,730	1,547	0,694	0,729	0,688	1,063	0,720	0,737	0,769
E	1,670	0,626	1,466	0,616	1,319	0,626	1,060	0,607	0,668	0,610	0,635	0,616
F	1,374	0,516	1,208	0,540	1,125	0,521	0,920	0,556	0,790	0,525	0,544	0,571
G	1,250	0,459	1,161	0,452	1,030	0,442	0,729	0,453	0,689	0,459	0,446	0,454
H	0,655	0,223	0,711	0,269	0,702	0,312	0,483	0,297	0,437	0,322	0,290	0,288

Примітки: 1) + - позитивна сироватка до аденовірусу першого серотипу; 2) - - негативна сироватка до аденовірусу першого серотипу; 3) Лунки А 1-10 - кон'югат у розведенні 1:100; 4) Лунки В 1-10 - кон'югат у розведенні 1:1000; 5) Лунки С 1-10 - кон'югат у розведенні 1:2000; 6) Лунки D 1-10 - кон'югат у розведенні 1:3000; 7) Лунки Е 1-10 - кон'югат у розведенні 1:4000; 8) Лунки F 1-10 - кон'югат у розведенні 1:5000; 9) Лунки G 1-10 - кон'югат у розведенні 1:6000; 10) Лунки H 1-10 - кон'югат у розведенні 1:10000.

Таким чином, оптимальним розведенням кон'югату у цьому досліді було 1:10000, і ІФА з одержаними компонентами відповідав необхідним вимогам до таких реакцій.

При порівнянні двох методів: високошвидкісного центрифугування через «подушку» 30 % сахарози і через градієнт сахарози та хлориду цезію результати ІФА показали низьку специфічність I варіанту очищення антигену – результат реакції був позитивний з сироватками, що мали антитіла до ІБК, ІБХ, ІЛТ та СЗН (табл. 3), що не відповідає необхідним вимогам до таких реакцій.

Таблиця 3 – Визначення рівня антитіл у сироватках крові курчат (1 варіант очистки антигену) (опт. щільність)

Негативна сироватка	Позитивні сироватки						
	аденовірус	аденовірус	аденовірус	ІБХ	ІБК	СЗН	ІЛТ
0, 112	0, 893	1, 054	1,323	0,680	0,768	0,841	0,713

З метою підвищення специфічності антигену були проведені наступні дослідження щодо очищення антигену. Очищений і сконцентрований за II варіантом антиген перевіряли в реакції ІФА з сироватками, що мали антитіла до вірусів аденовірусу I серотипу, ІБК, ІБХ та СЗН. Результати аналізу показали, що оптична щільність з негативною сироваткою була на рівні 0,207 опт. од. Позитивна сироватка з антитілами проти аденовірусу показала оптичну щільність у три рази вищу (0,747; 0,653 і 0,640) – результат позитивний. Показники оптичної щільності сироваток крові з антитілами до ІБК, ІБХ і СЗН не перевищували величину оптичної щільності негативної сироватки у 2 рази (табл. 4) – результат негативний.

Таблиця 4 – Визначення рівня антитіл у сироватках крові курчат (2 варіант очистки антигену) (опт. щільність)

Негативна сироватка	Позитивні сироватки						
	аденовірус	аденовірус	аденовірус	ІБХ	ІБК	СЗН	ІЛТ
0,207	0,747	0,653	0,640	0,308	0,380	0,291	0,198

Таким чином, результати ІФА з новим антигеном відповідали необхідним вимогам до таких реакцій.

Висновки. Антиген авіадееновірусу першого серотипу штам СЕЛО сконцентрований і очищений на градієнті: 10 % сахарози – 50 % сахарози з 35% хлоридом цезію із плавучою щільністю 1,304±0,002 г/см³ може бути використаний для створення тест-системи ІФА щодо визначення антитіл до авіадееновірусу з метою контролювання захворювання курей на ААВІК.

Список літератури

1. Стегній, Б.Т. Методичні рекомендації з діагностики, профілактики та ліквідації авіадееновірусної інфекції курей першого серотипу / Б.Т. Стегній, С.В.Ткаченко // Харків. – 2008.
2. Инфекционная патология животных: В 2 т./ Под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В.Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т.1. – 911 с.
3. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В.Фомина // М.: ВНИТИБП, 1998. – 928 с.
4. Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных иммуноферментным методом // Под ред. А.А.Гусева. – Владимир, 1998. – 179 с.
5. Фримель, Г. Иммунологические методы. – М.: Медицина, 1987 – 472 с.

PRODUCTION OF ANTIGEN FOR CONTROL OF CHICKEN ADENOVIRAL INFECTION OF THE FIRST SEROTYPE ON BASIS OF IFA

Stegniy B.T., Antonov V.S., Rudenko O.P., Kovalenko L.V., Mihaylova S.A., Tkachenko S.V., Usova L.P.
National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv,

Semenchenko O.Yu.

Institute at problems of cryobiology and cryomedicine of NAS of Ukraine, Kharkiv

Results of development of method of purification and reduction of antigen for IFA are presented in the article. Antigen of aviadenovirus of the first serotype of strain CELO concentrated and purified on gradient of 10 % saccharose – 50 % saccharose with 35 % caesium chloride with buoyant density 1,304±0,002 g/cm³ can be used for creation of test-system IFA concerning determination of antibodies to aviadenovirus with the purpose of control of chicken aviadenoviral infection of the first serotype.