

ДНК (единичные молекулы анализируемой ДНК), разрушенная ДНК (ДНК из старых/древних биоматериалов или подвергшихся химическому и/или физическому воздействию), смесь ДНК (искомая + фоновая) ПЦР-анализ становится нетривиальной задачей, требующей методических отклонений от традиционных подходов.

Нами изучена возможность использования метода полимеразной цепной реакции с системой праймеров «встык» для детекции разрушенной ДНК. Были подобраны 2 пары праймеров к ДНК пчелы: праймеры «встык» (*aF-aR*), отжиг 3'-концов которых происходит на смежных нуклеотидах комплементарных цепей матрицы без образования нуклеотидного промежутка, и «классические» (*F-R*) праймеры с расстоянием между праймерами более 200 нуклеотидов. Длина продуктов ПЦР для праймеров «встык» составила 38 пар оснований, для «классических» праймеров – 255 пар оснований.

В модельной системе на искусственно фрагментированной ДНК показано, что сближенное расположение прямого и обратного праймеров обеспечивает эффективную амплификацию при сохранении ее специфичности, в то время как использование стандартных праймеров не приводит к образованию специфических ампликонов. Важным преимуществом системы праймеров «встык» является сокращение общего времени реакции, поскольку амплификация коротких фрагментов не требует установления больших величин времени денатурации, отжига и элонгации.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИММУНОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСА ЯЩУРА НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Гусева К.А.^{1,2}, Руденко Н.В.^{1,2}, Шепеляковская А.О.¹, Каратовская А.П.^{1,2}, Бровко Ф.А.^{1,2}

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ²ФГБОУ ВПО Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия

gkseniya92@mail.ru

Ящур – острая инфекция вирусного происхождения, протекающая с интоксикацией и поражением слизистых оболочек полости рта, носа, кожи. Определяют 7 серотипов вируса (А, О, С, Азия-1, SAT -1, -2 и -3) и большое количество вариантов антигенных характеристик. Для России характерны типы А, О и Азия-1. Ситуацию осложняют множественность путей передачи инфекции, узкая специфичность приобретенного иммунитета, бессимптомные формы течения болезни и существование клинически сходных болезней животных. В связи с этим остро встает задача разработки специфических экспресс методов диагностики ящура.

Возбудитель ящура – сферический РНК-содержащий вирус семейства *Picornaviridae*, рода *Aphthovirus*. Белковый состав вириона представлен поверхностными структурными белками VP1, VP2, VP3. VP4 располагается внутри. Белок VP1 в большой степени ответственен за антигенные различия между серотипами вируса и несет эпитопы, к которым в организме инфицированного животного синтезируются диагностически значимые антитела.

Целью работы являлась разработка метода иммунохимического определения штаммов Шамир и ПанАзия вируса ящура на основе моноклональных антител (МА).

С помощью гибридной технологии была получена панель МА к вирусу ящура. 19 антител было получено после иммунизации денатурированным препаратом 146S частиц вируса штамма Шамир, 3 антитела – после гибридизации нативным препаратом 146S частиц вируса типа Азия. Независимо от способа иммунизации полученные антитела узнавали как нативные, так и денатурированные препараты 146S частиц вируса как штамма Шамир, так и штамма ПанАзия. За исключением МА Я7, узнающего в нативной конформации только 146S частицы препарата штамма ПанАзия. Антитела окрашивали белковую полосу, соответствующую VP1, в препаратах 146S частиц обоих штаммов, что было показано методом вестерн-блотт-анализа.

Тест-системы для детекции штаммов Шамир и ПанАзия разрабатывали в формате сэндвич – иммуноферментного анализа. В результате было выявлено, что детектирующие пары МА ШЯ54+ШЯ52bio и ШЯ54+ШЯ63bio определяли частицы вирусов обоих штаммов одинаково вплоть до концентрации 0,78 нг/мл. Пары антител ШЯ61+ШЯ101bio и ШЯ54+ШЯ54bio эффективнее выявляли частицы штамма ПанАзия, чем штамма Шамир. При этом пара