



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **279**

(51)) **МПК(2006) А 61 К**
31/729

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения**

К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

1

(21) 0900346

(22) 07.08.2009

(46) Бюл.56 (4), 2009

(71) Мирзоев Д.М. (ТJ).

(72) Мирзоев Д.М. (ТJ); Мирзоева В.М. (ТJ); Бо-
лышев В.М. (ТJ); Тураев Р.А. (ТJ).

(73) Мирзоев Д.М. (ТJ).

(54) **СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ АГАРОЗНОГО
ГЕЛЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТ-
НЫХ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ.**

(57) Изобретение относится к ветеринарной меди-
цине, в частности, к способу приготовления ага-
розного геля для проведения анализов методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР), применяю-
щейся в ветеринарии для выявления инфекцион-

2

ных возбудителей с высокой антигенной изменчи-
мостью и внутриклеточных паразитов, единичных
клеток бактерий, вирусов, а также для быстрого
диагностирования болезни на уровне ДНК.

Сущность способа заключается в следующем:
2 г агарозы смешивают с 100 мл однократного
буфера и кипятят до полного растворения агарозы.
Далее, гель охлаждают до температуры +450С,
заливают в специальную форму с гребенкой и
ставят в холодильник до затвердения. В образо-
вавшиеся от зубцов гребенки лунки вносят по 10
мкл окрашенной водной фазы и проводят электро-
форез при напряжении 8 вольт/см. Амплифициро-
ванные фрагменты ДНК выявляются в виде светя-
щихся красноватых полос.

Изобретение относится к ветеринарной медицине, в частности, к способу приготовления агарозного геля для проведения анализов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), применяющейся в ветеринарии для выявления инфекционных возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов, единичных клеток бактерий, вирусов, а также для быстрого диагностирования болезни на уровне ДНК.

Аналоги заявленного технического решения не выявлены.

Целью изобретения является приготовление агарозного геля для получения более точной реакции, четких достоверных результатов, и самое главное преимущество - экономия рабочего времени для быстрого диагностирования болезни.

Высокая специфичность полимеразной цепной реакции (ПЦР) обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя ДНК, для выявления единичных клеток бактерий или вирусов-возбудителей инфекций даже в тех случаях, когда другими видами анализов (бактериологическими, микроскопическими) это провести нереально.

Анализом полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно диагностировать сразу несколько возбудителей инфекции из одной биопробы. Анализ ПЦР значительно снижает время получения результатов диагностики. Применение ПЦР очень эффективно в отношении не только острых, но и вялотекущих, скрытых инфекций.

Для проведения анализа используются разные биологические выделения (моча, слезь, мокрота и т. д.) кровь, плазма, сыворотка, соскобы эпителиальных клеток, плевральная и спинномозговая жидкость, биоптаты. Кроме того, методом ПЦР возможно выявление возбудителей не только в клиническом материале, полученном от больного, но и в материале, получаемом из объекта внешней среды (вода, почва и т. д.).

Поставленная цель была достигнута на основе изучения многократной постановки опытов методом полимеразной цепной реакции.

Агарозный гель готовят следующим образом: в термостойкой посуде к 100 мл однократного буфера для электрофореза добавляют 2 г агарозы и на электроплите или в микроволновой печи доводят до кипения до полного растворения агарозы. Расплавленную агарозу охлаждают до температуры $+45^{\circ}\text{C}$, постоянно перемешивая, размешивают, заливают в специальную форму с гребенкой и ставят в холодильник для затвердения. Форму с образовавшимся агарозным гелем переносят в аппарат для горизонтального электрофореза, погружают в буфер и осторожно вынимают гребенку.

Приготовление буфера для электрофореза. Буфер можно приготовить по следующей прописи: навеску 4,04 г. основного Триса (гидроксиламинометана) растворяют в 200 мл дистиллированной воды, добавляют 1,14 мл ледяной уксусной кислоты и 2 мл 0,5 М раствора этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) pH 8 и доводят объем буфера до 1000 мл дистиллированной водой. После растворения всех компонентов добавляют 40 мкл раствора бромистого этидия. Буфер можно хранить при комнатной температуре не более 7 дней или при температуре $+2 - +6^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца.

Повторно гель можно растворить при температуре $+60 - +80^{\circ}\text{C}$ в магнитной мешалке, разлить в формы и поставить в холодильник для затвердения. С гелем должны обращаться очень аккуратно, чтобы не образовались пузырьки воздуха. В случае образования пузырьков, их желательно отодвинуть пипеткой к стенке формы, подальше от гребенки.

Гребенку с формы надо снять очень осторожно, чтобы не деформировать лунки агарозного геля, которые образовались при снятии от зубцов гребенки.

В пробирки с исследуемыми образцами вносят по 3 мкл буфера для нанесения образца и по 10 мкл окрашенной водной фазы и вносят в лунки агарозного геля, образовавшиеся от зубцов гребенки.

Электрофорез проводят при напряжении 8 вольт/см длины геля до тех пор, пока краситель пройдет от старта не менее половины геля, так как ширина пластинки агарозного геля равняется 6 см, поэтому аппарат вставляется при напряжении 50 В. Направление движения образцов в геле от «минуса» к «плюсу».

Результаты электрофореза являются основанием для заключения о наличии или отсутствии возбудителя болезни в исследуемом образце.

Результаты электрофореза учитывают, просматривая гель в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе «Трансиллюминатор».

Амплифицированные фрагменты ДНК выявляются в виде светящихся красноватых полос (положительные пробы).

В отрицательной пробе не выявляется никаких полос или полосы не соответствуют по размеру фрагменту в контрольной пробе.

После электрофореза для учёта результатов реакции гель вставляется в прибор «Трансиллюминатор» для чёткой реакции.

Пример конкретного осуществления способа.

Агарозу из одной пробирки пересыпали в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл, налили 100 мл однократного буфера и кипятят на электроплитке до полного растворения агарозы (периодически перемешивая стеклянной палочкой, чтобы предотвратить пригорание агарозы), после этого агарозу остудили, постоянно пе-

ремешивая до температуры +45°C.

5

Расплавленный гель залили в специальную форму и поставили гребенки на расстоянии друг от друга не менее 3 см и ставили в холодильник для затвердения. После полного застывания геля, из него осторожно вынули гребенки. Далее, подготовленные пробы смешивали с 3 мкл буфера и по 10 мкл окрашенной водной фазы вносили в лунки агарозного геля, образовавшиеся от зубцов гребенки.

В результате просмотра геля в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе «Трансиллюминатор» амплифицированные фрагменты ДНК выявляются в виде светящихся красноватых полос.

В процессе проведения опытов методом полимеразной цепной пришли к выводу:

а) агарозный гель, приготовленный за сутки для постановки реакции на ПЦР, более удобен по расходованию времени, а также созреванию геля.

Такой гель при положительной пробе выявля-

279

ет красноватую полосу, не расплавляется, что дает

6

возможность получить четкий и точный результат реакции на ПЦР, чем гель, приготовленный по обычной методике, где полосы расплавляются и усложняют четко определить диагноз болезни.

б) агарозный гель, приготовленный заранее, способствует сокращению хода проведения реакции во времени. Хранение, заранее приготовленного агарозного геля в холодильнике, не влияет на его химический состав и форму, что необходимо для получения точного диагноза при проведении опытов методом полимеразной цепной реакции.

в) агарозный гель, приготовленный в ходе реакции, хорошо не созревает до однородной массы, внесенные в него пробы и буфер образца не дают желаемого результата. Такой гель, в отрицательной пробе, не выявляет никаких полос, расплавляется или полосы не соответствуют по размеру фрагменту в положительной пробе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ приготовления агарозного геля для диагностики болезней животных методом полимеразной цепной реакции **закключающийся в том, что** 2 г агарозы смешивают с 100 мл однократного буфера, содержащего 4,04 мл основного Триса (гидроксиламинометана), 200 мл дистиллированной воды, 1,14 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл 0.5 М раствора этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)

рН 8 и 40 мкл раствора бромистого этидия, кипятят до полного растворения агарозы, охлаждают до температуры +45°C, заливают в специальную форму с гребенкой и ставят в холодильник до затвердения, в образовавшиеся от зубцов гребенки лунки вносят по 10 мкл окрашенной водной фазы и проводят электрофорез при напряжении 8 вольт/см.

Компьютерный набор: Назарова Дж.Д.

Заказ

Тираж

Подписное

Национальный патентно-информационный центр РТ
734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а.