

**М.Д. Алмежанова<sup>1,2\*</sup>, К.А. Шораева<sup>1</sup>, А.А. Тлепов<sup>2</sup>, Н.Т. Туменбаева<sup>2</sup>,  
Н.Н. Мухами<sup>1</sup>, К.Д. Закарья<sup>1</sup>, К.Т. Султанкулова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,  
Казахстан, пгт. Гвардейский

<sup>2</sup>Таразский государственный университет им. М.Х. Дулати,  
Казахстан, г. Тараз, e-mail: meirima\_89@mail.ru

## **ПОДБОР И ОПТИМИЗАЦИЯ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА МЕТОДОМ ПЦР**

Актуальным направлением ветеринарной диагностики является разработка диагностических тест-систем для выявления возбудителей инфекций, что позволит поддерживать благоприятную экологическую обстановку окружающей среды. Взаимодействие человеческого общества и природы стало одной из важнейших проблем современности. На пути решения экологических проблем учеными мира разрабатываются разные методы борьбы и профилактики инфекционных заболеваний. Разработка отечественной тест-системы для лабораторной диагностики нодулярного дерматита крупного рогатого скота (НД КРС) с применением современных молекулярно-генетических методов является значимой задачей, которая позволит выявить дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) вируса НД быстро и точно на ранних стадиях заболевания. Целью нашего исследования является подбор и оптимизация компонентного состава тест-системы для лабораторной диагностики нодулярного дерматита методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В статье представлены результаты работ по подбору и оптимизации компонентного состава тест-системы и отработке температурно-временного режима метода ПЦР. В ходе эксперимента проводились работы по оптимизированию концентраций основных компонентов реакционной смеси – праймеров, дНТФ, MgCl<sub>2</sub>, а также Taq ДНК-полимеразы. По полученным экспериментальным данным для наработки специфического продукта нодулярного дерматита достаточно 0,25 мкл (5 ед/мкл) Taq ДНК-полимеразы, по 1 мкл (20 пмоль) праймеров, 25 мМ MgCl<sub>2</sub> – 2 мкл и смеси дНТФ (10 мМ) – 1 мкл в объеме 25 мкл для постановки ПЦР с отработанным температурно-временным режимом. В результате проведенных исследований впервые в Республике Казахстан отработаны условия постановки ПЦР, позволяющие идентифицировать вирус нодулярного дерматита КРС. На основе полученных результатов в ветеринарной практике республики будет создана тест-система для диагностики нодулярного дерматита на основе ПЦР.

**Ключевые слова:** нодулярный дерматит, полимеразная цепная реакция, тест-система, диагностика, окружающая среда.

M.D. Almezhanova<sup>1,2\*</sup>, K.A. Shorayeva<sup>1</sup>, A.A. Tlepov<sup>2</sup>, N.T. Tumenbayeva<sup>2</sup>,  
N.N. Mukhami<sup>1</sup>, K.D. Zakarya<sup>1</sup>, K.T. Sultankulova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Biological Safety Problems, Kazakhstan, Gvardeyskiy

<sup>2</sup>Taraz State University named after M.Kh. Dulati, Kazakhstan, Taraz, e-mail: meirima\_89@mail.ru

### **Design and optimization of the test-system component composition for laboratory diagnosing of lumpy skin disease by PCR**

The actual direction of veterinary diagnostics is the development of diagnostic test systems for the detection of infectious agents, which will help maintain a favorable ecological environment. The interaction of human society and nature has become one of the most important problems of our time. On the way of solving environmental problems, the world scientists are developing different methods of combating and preventing infectious diseases.

The actual direction of veterinary diagnostics is the development of diagnostic test-systems for identifying infectious agents. The development of a domestic test-system for laboratory diagnosing lumpy skin disease of cattle (LSD) using modern molecular-genetic methods is the most important task that will allow detecting deoxyribonucleic acid (DNA) of LSD virus quickly and accurately in the disease early stages. The aim of study is the design and optimization of the test-system component composition for

laboratory diagnosing LSD by polymerase chain reaction (PCR). The given article presents the results of the design and optimization of the test-system component composition and working out the temperature and time regime of the PCR.

During the experiment was optimized the concentrations of the reaction mixture main components – primers, dNTPs,  $MgCl_2$ , and Taq DNA polymerase. According to the obtained experimental data, 0,25  $\mu l$  (5 units/ $\mu l$ ) of Taq DNA polymerase, 1  $\mu l$  (20 pmol) of primers, 25 mM  $MgCl_2$  – 2  $\mu l$  and dNTPs Mix (10 mM) – 1  $\mu l$  are enough to produce a specific product of LSD in a volume of 25  $\mu l$  for PCR with the processed temperature and time regime.

As a result of the conducted studies, for the first time in the Republic of Kazakhstan have been processed the PCR conditions to identify the LSD virus.

Based on the results obtained will be created a test-system in the veterinary practice of the Republic for the diagnosing LSD based by PCR.

**Key words:** lumpy skin disease, polymerase chain reaction, test-system, diagnosis, environment.

М.Д. Алмежанова<sup>1,2\*</sup>, К.А. Шораева<sup>1</sup>, А.А. Тлепов<sup>2</sup>, Н.Т. Түменбаева<sup>2</sup>,  
Н.Н. Мухами<sup>1</sup>, К.Д. Закарья<sup>1</sup>, К.Т. Султанкулова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан, Гвардейск қтк.

<sup>2</sup>М.Х. Дулати атындағы Тараз мемлекеттік университеті, Қазақстан, Тараз қ., e-mail: meirima\_89@mail.ru

### **ПТР әдісі арқылы нодулярлық дерматит ауруын зертханалық балауға арналған сынақ-жүйесінің компоненттік құрамын таңдау және оңтайландыру**

Инфекциялардың қоздырғыштарын анықтауға арналған диагностикалық сынақ-жүйелерін әзірлеу – қоршаған ортаның қолайлы экологиялық жағдайын қолдауға мүмкіндік беретін ветеринариялық диагностиканың нақты бағыты. Адамзат қоғамы мен табиғаттың өзара әрекеті қазіргі заманның маңызды проблемаларының бірі болып табылады. Экологиялық мәселелерді шешу жолында әлемнің ғалымдары инфекциялық аурулардың алдын алу және күресудің түрлі әдістерін әзірлеуде. Қазіргі заманғы молекулалық және генетикалық әдістерді қолдана отырып, нодулярлық дерматит вирусының дезоксирибонуклеотидті қышқылын (ДНҚ) аурудың ерте сатысында тез және дәл анықтауға мүмкіндік беретін ірі қара малдың (ІҚМ) нодулярлық дерматит ауруын (НД) зертханалық балауға арналған отандық сынақ-жүйесін әзірлеу маңызды міндет болып табылады. Зерттеудің мақсаты – полимеразды тізбекті реакция (ПТР) арқылы нодулярлық дерматит ауруын зертханалық балауға арналған сынақ-жүйесінің компоненттік құрамын таңдау және оңтайландыру. Мақалада сынақ-жүйенің компоненттік құрамын таңдау мен оңтайландыру және ПТР әдісінің температуралық және уақыттық режимін өңдеу нәтижелері келтірілген.

Тәжірибе барысында реакциялық қоспаның негізгі компоненттері – праймерлердің, дНТФ,  $MgCl_2$ , сондай-ақ, Тақ ДНҚ полимеразаның концентрацияларын оңтайландыру бойынша зерттеу жұмыстары жүргізілді. Алынған тәжірибелік мәліметтерге сәйкес, 25 мкл көлемін құрайтын 0,25 мкл (5 бірлік/мкл) Тақ ДНҚ полимеразы, 1 мкл-ден (20 пмоль) праймерлер, 2 мкл 25 mM  $MgCl_2$  және 1 мкл дНТФ қоспасы (10 mM) ПТР қою үшін оңтайландырылған температуралық және уақыттық режимдік параметрлерімен нодулярлық дерматиттің ерекше бір өнімін алуға жеткілікті екендігі анықталды.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде Қазақстан Республикасында алғаш рет ІҚМ нодулярлық дерматит вирусын сәйкестендіруге мүмкіндік беретін ПТР қою шарттары пысықталды.

Алынған нәтижелер негізінде республиканың ветеринариялық практикасында ПТР негізінде нодулярлық дерматитті диагностикалауға арналған сынақ-жүйе құрылатын болады.

**Түйін сөздер:** нодулярлық дерматит, полимеразды тізбекті реакция, сынақ-жүйе, диагностика.

## **Введение**

Нодулярный дерматит крупного рогатого скота (НД КРС) является вирусной высококонтагиозной трансграничной болезнью крупного рогатого скота, которая сопровождается лихорадкой, образованием некротизирующихся кожных узлов (бугорков), генерализованным лимфаденитом, вызывает отеки конечностей, поражает глаза и слизистые оболочки органов дыхания, репродукции и процесса переваривания

пищи. Возбудитель болезни – вирус, который содержит ДНК семейства *Poxviridae* рода *Capripoxvirus* группы Neethling. Вирус НД антигенно близок с вирусами оспы овец и коз. Вирионы вируса Neethling идентичны по морфологическим свойствам вирусу оспы овец, которые имеют круглую форму с двойной оболочкой и плотной сердцевинной [1-4]. По данным Кодекса здоровья наземных животных МЭБ 2016, только крупный рогатый скот и азиатские буйволы подвержены заболеванию нодулярным дерматитом [5, 6].

За последние несколько лет из-за расширения торговых отношений и вследствие действия природных факторов каприпоксвирусы стали массово распространяться в северных регионах стран Ближнего Востока, Европы, Турции и России [7]. В настоящее время вирус нодулярного дерматита крупного рогатого скота считается наиболее опасным. Важно отметить, этот вирус не обошел стороной и Республику Казахстан. Впервые вспышки вируса нодулярного дерматита были зарегистрированы в 2016 году в Атырауской области Республики Казахстан [8]. Источник возбудителя (вирусоносители) – животные, которые болеют данным заболеванием, а также переболевшие и латентно инфицированные [9].

Диагностирование нодулярного дерматита крупного рогатого скота является острой проблемой в Республике Казахстан. Экстренная и достоверная диагностика с помощью метода ПЦР, а также быстрое осуществление мер контроля очень важны для своевременной профилактики и предотвращения распространения НД КРС на территории страны. Самым наиболее современным и достоверным методом диагностики на сегодняшний день является полимеразная цепная реакция.

Лабораторное подтверждение НД КРС в районе или области, где подозрение на заболевание возникает впервые, предусматривает выделение вируса на культуре клеток [10] или положительный результат в ПЦР на наличие ДНК вируса НД [11]. Исходя из литературных данных, для диагностики разработаны как классическая ПЦР [12, 13], так и количественная ПЦР в режиме реального времени [14, 15], которые по сравнению с другими методами, такими, как ИФА, электронная микроскопия и вирусовыделение, имеют очевидное преимущество по доступности, чувствительности и специфичности [16].

Тяжелые случаи НД легко распознать, поскольку они сопровождаются весьма характерными признаками. Но на ранних стадиях инфекции и при легких формах заболевания требуется лабораторное подтверждение с помощью ПЦР – так можно оперативно и надежно определить заболевание.

На сегодняшний день ПЦР-анализ остается наиболее распространенной и динамично развивающейся технологией. Ежегодно как за рубежом, так и в стране разрабатываются и внедряются в практику ПЦР тест-системы, предназначенные для выявления возбудителей различных заболеваний. Для разработки качественной тест-системы необходимы работы по

анализу нуклеотидных последовательностей целевых генов нодулярного дерматита КРС, подбору праймеров, отработке и подбору оптимальных условий постановки метода ПЦР.

В связи с этим, целью нашего исследования являлось, подбор и оптимизация компонентного состава тест-системы для лабораторной диагностики нодулярного дерматита методом ПЦР.

### Материалы и методики

Для проведения оптимизации параметров постановки ПЦР в работе были использованы в качестве положительного контроля плазмидная ДНК фрагмента гена штамма «Dermatitis nodulares/Atyray/KZ/2016» вируса нодулярного дерматита (347 п.о.), в качестве отрицательного контроля – деионизированная вода; две пары праймеров LSDV-1-f и LSDV-1-r, LSDV-2-f и LSDV-2-r; термостабильная ДНК-полимераза – фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов – *Thermal aquaticus* (Taq ДНК-полимераза); смесь дНТФ; ионы  $Mg^{2+}$  – необходимые для работы полимеразы;  $\times 10$  ПЦР-буфер, обеспечивающий необходимые условия реакции.

Приготовление положительного контроля. Для получения положительного контроля, используемого при диагностике нодулярного дерматита, проводили лигирование (вставка ПЦР-продукта в состав вектора) наработанного ПЦР-продукта и вектора pGEM-T (из набора pGEM-T Vector; Promega) согласно протоколу производителя. Трансформировали ранее полученную лигирующую смесь в компетентные клетки *E. coli* штамм Top10. Далее проводили селективный отбор колонии с корректными вставками. Приготовили ночную культуру из отобранных колонии. На последнем этапе была выделена плазмидная ДНК.

Выделение ДНК. Образцы исследуемого биологического материала мелко нарезают с помощью скальпеля и помещают в ступки с песком. Материал растирают до образования однородной массы и добавляют физиологический раствор для получения 20 %-ной суспензии (вес/объем). Далее выделение вирусной ДНК проводили по методике с использованием сорбента.

Для этого на 450 мкл лизирующего буфера (рН 6,5) добавили 100 мкл образца, вортиксовали в течение 15 с, затем инкубировали 10 мин

при комнатной температуре. Далее добавили 450 мкл изопропанола и 5 мкл сорбента (перед добавлением сорбента тщательно перемешали), вортиксировали 15 с, затем инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Центрифугировали при максимальной скорости 1 мин. Удалили супернатант с помощью наконечника, а осадок промыли 500 мкл промывочным буфером (pH 6,5), вортиксировали 15 с, затем поставили на центрифугирование при максимальной скорости 30 с (промывку проводили 2 раза). Супернатант аккуратно удалили с помощью наконечника и промыли осадок 500 мкл 75 % этанолом, вортиксировали 15 с, затем центрифугировали при максимальной скорости 30 с. Супернатант удалили с помощью наконечника, осадок сушили при 56 °С в течение 10-15 мин до полного высушивания. Элюция: добавили 50 мкл деионизированной воды, инкубировали при 56 °С в течение 10 мин, вортиксировали 10 с, центрифугировали при максимальной скорости 1 мин. Надосадок – ДНК перенесли в чистую пробирку. Чистоту полученных препаратов ДНК проверяли на аппарате Nanodrop/2000 по отношению оптических плотностей при длинах волны 260 нм и 280 нм (E260/E280).

Конструирование и синтез праймеров. Анализ последовательностей генома вируса НД КРС проведен в базе данных NCBI, для подбора специфичных праймеров был выбран ген GPCR, кодирующий хемокиновый рецептор.

Поиск и отбор нуклеотидных последовательностей сегментов нодулярного дерматита КРС проведен в международной базе данных GenBank. Анализ нуклеотидных последовательностей генов или их отдельных фрагментов осуществлены с помощью компьютерной программы Vector NTI Suite 9. При выборе праймеров использованы следующие требования: длина праймеров 17-28 н.; процентное содержание G+C пар – 40-60; избегать залипания праймеров самого на себя; образования димеров; температура плавления в пределах 52-59 °С.

Конструированные праймеры были синтезированы на синтезаторе олигонуклеотидов Synthesizer H-16 (производство Германия) согласно инструкции, прилагаемой к прибору [17].

Проведение ПЦР. Для амплификации ДНК вируса нодулярного дерматита использовали реакционную смесь объемом 25 мкл, состоящую из Taq ДНК полимеразы – 0,25 мкл (5 ед/мкл); ×10 ПЦР-буфер – 2,5 мкл; специфические праймеры (20 пМ) LSDV-2-F-5'-ATGATGGTGTGGATACT-3' и LSDV-2-R-

5'-GGCATTGATTTTACTGGG-3' – по 1 мкл каждого; смесь дНТФ (10 мМ) – 1 мкл; 25 мМ раствор хлорида магния – 2 мкл; ДНК – 3 мкл; деионизированная вода – 14,25 мкл. Нарботка ПЦР продуктов проведена в термоциклере GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США) согласно следующему режиму амплификации: 94 °С – 3 мин, 35 циклов, 94 °С – 20 сек, 59 °С – 20 сек, 72 °С – 40 сек и 72 °С – 7 мин, 4°С – хранение.

Электрофоретический анализ продуктов амплификации ДНК. Электрофорез продуктов амплификации ДНК вируса нодулярного дерматита проводили в аппарате для горизонтального электрофореза «G-100», фирмы «Pharmacia». Для электрофореза использовали 1,5 % раствор агарозы в ТАЕ-буфере. Документирование полученных результатов проводили при помощи фотографирования гелей, в гель документирующей системе «BioRad». В качестве маркера молекулярных масс использовали «DNA Ladder 1kb» фирмы «Qiagen».

### Результаты и обсуждение

От концентрации и качества 5 основных компонентов реакционной смеси (ДНК-матрица, Taq ДНК-полимераза, праймеры, смесь дНТФ и ионы Mg<sup>2+</sup>) и температурного режима ПЦР зависит специфичность, чувствительность метода ПЦР, а также количество амплифицируемой ДНК.

Подбор и оптимизация концентрации праймеров. Авторами ранее были проведены работы по подбору праймеров для диагностики нодулярного дерматита крупного рогатого скота [17]. Подбор праймеров проводили с использованием программы Vector NTI для проведения диагностики нодулярного дерматита КРС. В ходе экспериментов были подобраны две пары праймеров: LSDV-1-f и LSDV-1-r, LSDV-2-f и LSDV-2-r.

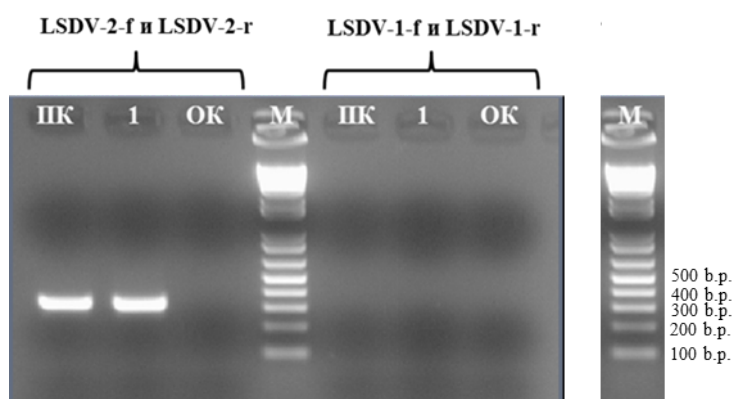
Характеристика специфичных олигонуклеотидных праймеров для обнаружения гена вируса нодулярного дерматита КРС представлена в таблице 1.

При проведении ПЦР очень важно правильно подобрать температуру отжига праймеров. С увеличением температуры отжига начинает повышаться специфичность ПЦР-продукта. На основании выбранных в процессе экспериментов оптимальных параметров компонентного состава ПЦР смеси и температурно-временного режима для всех стадий амплификации были получены следующие результаты (рисунок 1):

**Таблица 1** – Основные характеристики специфических праймеров для постановки ПЦР на ген вируса нодулярного дерматита КРС

Название праймеров	Последовательность	Температура плавления, °	Содержание GC, %	Размер продукта, п.о.
LSDV 1F	GGAGTTTAGGAGATTGTTTG	54,3	40	132
LSDV 1R	GCATTGATTTTACTGGGTGA	54,5	40	
LSDV 2F	GATGATGGTGTGGATACT	53,2	44	347
LSDV 2R	GGCATTGATTTTACTGGG	52,8	44	

Примечание: п.о. – пар оснований



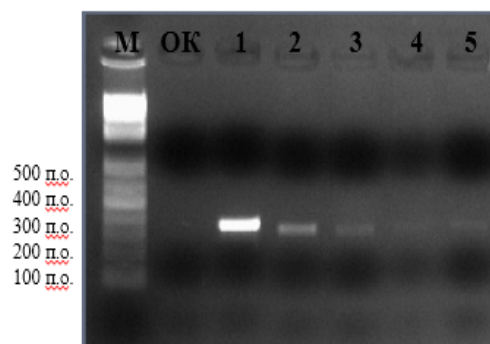
М – маркер «DNA Ladder 1kb», фирмы «Qiagen»; ПК – положительный контроль – плазмидная ДНК фрагмента гена штамма «Dermatitis nodulares/Atyray/KZ/2016» вируса нодулярного дерматита (347 п.о.); ОК – отрицательный контроль – H<sub>2</sub>O; 1 – ДНК вируса нодулярного дерматита

**Рисунок 1** – Электрофореграмма продуктов амплификации при использовании праймеров LSDV-1-f и LSDV-1-r, LSDV-2-f и LSDV-2-r

Амплифицированные пробы анализируются в 1,5% агарозном геле с использованием ТАЕ-буфера. Как видно из рисунка 1, при постановке ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров LSDV-1-f и LSDV-1-r были получены отрицательные результаты, тогда как с помощью праймеров LSDV-2-f и LSDV-2-r получены ПЦР продукты с ожидаемым размером 347 п.о. [17].

Полученные синтезированные праймеры разводили до концентрации 20 пмоль и использовали для отработки постановки ПЦР при диагностике вируса нодулярного дерматита.

Исследования по подбору оптимального расхода праймеров методом ПЦР показали следующие результаты, которые представлены на рисунке 2.



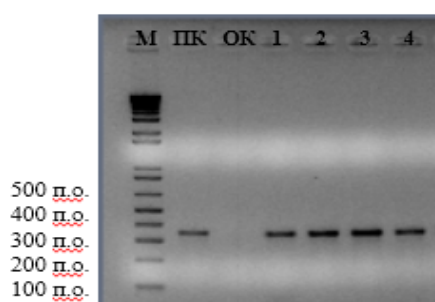
М – маркер «DNA Ladder 1kb», фирмы «Qiagen»; ОК – отрицательный контроль – H<sub>2</sub>O; 1 – 20 пмоль; 2 – 15 пмоль; 3 – 10 пмоль; 4 – 5 пмоль

**Рисунок 2** – Электрофореграмма оптимизации концентрации праймеров в реакционной смеси при идентификации ДНК вируса нодулярного дерматита методом ПЦР

По представленным результатам рисунка 2 можно увидеть, что на выход ПЦР продукта влияет использование праймеров в концентрациях от 5 пмоль до 20 пмоль. С повышением концентрации праймеров увеличивается выход и интенсивность амплифицированного фрагмента.

#### Оптимизация концентрации смеси дНТФ

Также провели эксперименты по определению оптимального расхода дНТФ на одну реакцию методом ПЦР. Результаты, подтверждающие проведенные исследования, представлены на рисунке 3.



М – маркер «DNA Ladder 1kb», фирмы «Qiagen»; ПК – положительный контроль – плазмидная ДНК фрагмента гена штамма «*Dermatitis nodularis/Atygray/KZ/2016*» вируса нодулярного дерматита (347 п.о.); ОК – отрицательный контроль –  $H_2O$ ; 1 – 5 мМ дНТФ; 2 – 10 мМ дНТФ; 3 – 15 мМ дНТФ; 4 – 20 мМ дНТФ

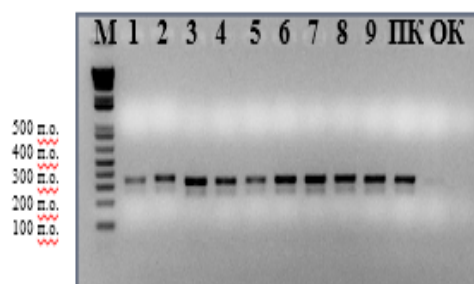
**Рисунок 3** – Электрофореграмма оптимизации концентрации дНТФ в реакционной смеси при идентификации ДНК вируса нодулярного дерматита методом ПЦР

Как видно из рисунка 3, изменение концентрации дНТФ в пределах 5-20 мМ влияет на процесс амплификации. С повышением концентрации дНТФ в реакционной смеси происходит увеличение накапливаемого продукта амплификации. Для приготовления реакционных смесей в дальнейших экспериментах при проведении ПЦР использовали 10 мМ смеси дНТФ.

#### Оптимизация концентрации $MgCl_2$

Концентрация  $MgCl_2$  влияет на отжиг праймеров и денатурацию образца. Изменение концентрации ионов  $Mg^{2+}$  может оказывать заметное влияние на эффективность и специфичность ПЦР. Рекомендованный интервал концентраций составляет 1-5 мМ. Если концентрация  $Mg^{2+}$  слишком мала, выход ПЦР продукта будет снижаться. С другой стороны, при высокой концентрации  $Mg^{2+}$  может наблюдаться появление не-

специфических продуктов и снижаться точность ПЦР [18, 19].



М – маркер «DNA Ladder 1kb», фирмы «Qiagen»; 1 – 1,0 мМ; 2 – 1,5 мМ; 3 – 2,0 мМ; 4 – 2,5 мМ; 5 – 3,0 мМ; 6 – 3,5 мМ; 7 – 4 мМ; 8 – 4,5 мМ; 9 – 5 мМ;

ПК – положительный контроль – плазмидная ДНК фрагмента гена штамма «*Dermatitis nodularis/Atygray/KZ/2016*» вируса нодулярного дерматита (347 п.о.);

ОК – отрицательный контроль –  $H_2O$

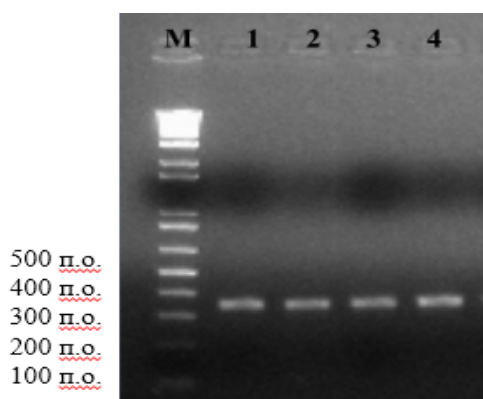
**Рисунок 4** – Оптимизация концентрации  $MgCl_2$  в реакционной смеси при обнаружении ДНК нодулярного дерматита методом ПЦР с праймерами LSDV-2-f и LSDV-2-r.

В результате проведенных работ по оптимизации концентрации  $MgCl_2$  в реакционной смеси при обнаружении ДНК нодулярного дерматита методом ПЦР было установлено, что выход специфического ПЦР-продукта был выше при концентрации  $MgCl_2$  начиная с 2,0 до 5,0 мМ (рис.4). Таким образом, оптимальной концентрацией  $MgCl_2$  является 2,0 мМ. На основании полученных результатов при проведении ПЦР для приготовления реакционных смесей была использована концентрация соли 2,0 мМ.

#### Оптимизация концентрации Taq ДНК-полимеразы

При проведении ПЦР основную роль играет фермент Taq ДНК-полимераза. Концентрация фермента в реакции подбирается в зависимости от индивидуальной мишени (ДНК) или праймеров. Если концентрация фермента слишком высокая, то могут образовываться неспецифические продукты, а если слишком низкая, то образуется недостаточное количество амплификата.

Концентрация Taq ДНК-полимеразы влияет на выход конечного продукта. Нужно отметить, что в разрабатываемой тест-системе полимеразы является самым дорогим компонентом. Поэтому в наших экспериментах для диагностики нодулярного дерматита мы выбрали экономичный расход фермента – 0,25 ед. Результат исследования приведен на рисунке 5.



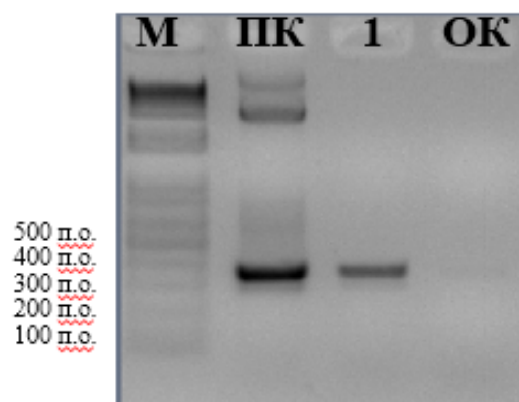
М – маркер «DNA Ladder 1kb», фирмы «Qiagen»;  
1 – 0,25 ед; 2 – 0,5 ед; 3 – 1 ед; 4 – 1,5 ед;

**Рисунок 5** – Электрофореграмма оптимизации концентрации Taq ДНК-полимеразы в реакционной смеси при идентификации ДНК вируса нодулярного дерматита методом ПЦР

На основании полученных экспериментальных данных для приготовления реакционных смесей в дальнейших экспериментах при проведении ПЦР использовали 0,25 ед. ДНК-полимеразы.

Подбор и отработка температурно-временного режима амплификации является очень важным и сложным моментом при разработке метода ПЦР. Температурный профиль амплифицируемого цикла соответствует трем последовательным стадиям ПЦР (денатурации матрицы при нагревании, отжигу праймеров с одноцепочечной матрицы и синтезу второй цепи с помощью термостабильной ДНК-полимеразы). Для каждой стадии подбирается своя определенная температура и время. В общем случае температура этапа денатурации обычно выбирается между 90-95 °С, отжига – между 40-60 °С, а достройки – между 70-75 °С [20].

В рамках проведенных нами работ по подбору температурно-временного режима для денатурации были использованы стандартные условия – 94 °С. Выбранный режим на первом же шаге гарантирует денатурацию матричной ДНК. Режим пре-денатурации был подобран при температуре 94 °С в течение 3 мин. Для температуры отжига использовали 59 °С. Нарботка ПЦР продуктов проведена в термоциклере GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США). Полученные пробы анализировали в 1,5 % агарозном геле, приготовленном на ТАЕ-буфере. Полученные результаты представлены на рисунке 6.



М – маркер «DNA Ladder 1kb», фирмы «Qiagen»;  
ПК – положительный контроль – плазмидная ДНК фрагмента гена штамма «Dermatitis nodulares/Atygray/KZ/2016» вируса нодулярного дерматита (347 п.о.);  
1 – ДНК вируса нодулярного дерматита;  
ОК – отрицательный контроль – H<sub>2</sub>O

**Рисунок 6** – Электрофореграмма амплифицированной ДНК вируса нодулярного дерматита

Таким образом, на основании подобранных температурно-временных параметров амплификации был выбран следующий режим для проведения ПЦР:

пре-денатурация: 94 °С – 3 мин  
денатурация: 94 °С – 20 сек  
отжиг: 59 °С – 20 сек 35 циклов  
элонгация: 72 °С – 40 сек  
финальная элонгация: 72 °С – 7 мин  
хранение: 4 °С – ∞

В результате проведенных нами исследований была проведена работа по подбору оптимальных условий постановки ПЦР для лабораторной диагностики нодулярного дерматита. Таким образом, для амплификации ДНК вируса нодулярного дерматита использовали реакционную смесь объемом 25 мкл, состоящую из Taq ДНК полимеразы – 0,25 мкл (5 ед/мкл); ×10 ПЦР-буфер – 2,5 мкл; специфические праймеры (20 пМ) LSDV-2-F-5'-ATGATGGTGTGGATACT-3' и LSDV-2-R-5'-GGCATTGATTTTACTGGG-3' – по 1 мкл каждого; смесь дНТФ (10 мМ) – 1 мкл; 25 мМ раствор хлорида магния – 2 мкл; ДНК – 3 мкл; деионизированная вода – 14,25 мкл. Постановка ПЦР была проведена согласно отработанному режиму амплификации: 94 °С – 3 мин, 35 циклов, 94 °С – 20 сек, 59 °С – 20 сек, 72 °С – 40 сек и 72 °С – 7 мин, 4 °С – бесконечность.

На рынке биопрепаратов существуют аналогичные тест-системы на основе ПЦР-РВ для диагностики нодулярного дерматита КРС. Зарубежные авторы публикации [7] сообщают,

что ПЦР-РВ позволяет предотвратить риск перекрестной контаминации при выявлении генома вируса НД, снижая вероятность ложноположительных результатов и сокращая продолжительность анализа, так как не требует изучения продуктов амплификации в агарозном геле. Также отмечают, что разработанный им метод ПЦР-РВ более чувствительный и позволяет проводить количественный анализ. Однако, наша ПЦР тест-система не уступает по параметрам специфичности, чувствительности и качеству аналогам зарубежных диагностикумов. Представленная нами тест-система представлена в виде готовых пробирок с реакционной смесью, в которые требуется внести образец исследуемого ДНК. Такая форма снижает вероятность ошибок оператора и риск контаминации реактивов при приготовлении смеси, повышает воспроизводимость результатов, а также уменьшает время и трудоемкость анализа.

Исходя из полученных результатов, стоит отметить, что отличительными особенностями тест-системы являются быстрота выделения ДНК вируса нодулярного дерматита (5-6 часов) из патологического материала, высокая чувствительность и специфичность.

## Выводы

Ключевым моментом в создании диагностических тест-систем для лабораторной диагностики инфекционных заболеваний с помощью метода ПЦР является подбор праймеров, отработка температурно-временного режима постановки метода ПЦР, определение специфичности

и чувствительности метода ПЦР, также оптимизация концентрации реакционной смеси.

В ходе экспериментальных работ установлено, что для проведения метода ПЦР при выявлении ДНК вируса нодулярного дерматита – оптимальная концентрация праймеров в составе реакционной смеси составляет по 20 пмоль каждого, дНТФ (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ) каждого в концентрации 0,4 мМ, ионов  $Mg^{2+}$  – 2,0 мМ, Таq-ДНК полимеразы – 0,25 ед. Программа амплификации включала предварительную денатурацию при температуре 94 °С в течение 3 мин, 35 циклов при 94 °С – 20 сек, 59 °С – 20 сек, 72 °С – 40 сек, далее 72 °С – 7 мин.

Полученные результаты в ходе данного исследования послужили основой для разработки отечественной диагностической тест-системы для обнаружения вируса нодулярного дерматита КРС методом ПЦР, которая будет применяться в ветеринарии.

**Конфликт интересов.** Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

*Работа выполнена в рамках ПЦФ: «Ветеринарная безопасность территории Республики Казахстан: эпизоотологический мониторинг, испытание, внедрение и коммерциализация средств специфической профилактики и диагностики особо опасных инфекционных заболеваний» (ИРН BR06249226) при финансировании Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан, договор № 28 от 10 сентября 2018 года.*

## Литература

- 1 Мищенко А.В., Мищенко В.А., Шевкопляс В.Н., Джаилиди Г.А., Дресвянникова С.Г., Черных О.Ю., Кононов А.В., Акбаев Р.М. Экологические особенности нодулярного дерматита крупного рогатого скота // Ветеринария Кубани. – 2017. – № 5. – С.22.
- 2 Scientific opinion on lumpy skin disease // EFSA Journal. – 2015. – Vol.13 (1). – P.3986.
- 3 Семкина В.П., Жильцова М.В., Саввин А.В., Акимова Т.П. Распространение заразного узелкового дерматита (Нодулярного дерматита) крупного рогатого скота в мире // Ветеринария сегодня. – 2017. – № 3 (22). – С.13.
- 4 Beard P.M. Lumpy skin disease: a direct threat to Europe. // Vet. Ec. – 2016. – Vol.28. – P. 557-558. DOI: 10.1136/vr.i2800.
- 5 Lumpy Skin Disease // OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.4.14, 2012. – P.762-776.
- 6 OIE-Terrestrial Animal Health Code. – 2016. – Vol.2. – P.605-608.
- 7 Пестова Я.Е., Артюхова Е.Е., Кострова Е.Е., Шумилова И.Н., Кононов А.В., Спрыгин А.В. Разработка ПЦР в режиме реального времени для выявления полевых изолятов вируса заразного узелкового дерматита в пробах от крупного рогатого скота // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т.53 (2). – С.422-429.
- 8 Рекомендации по борьбе с нодулярным дерматитом крупного рогатого скота в Республике Казахстан. – Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан Товарищество с ограниченной ответственностью «Казахский научно-исследовательский Ветеринарный институт» (ТОО «КазНИВИ»). – Алматы, 2017.
- 9 Ветеринарные правила осуществления мероприятий по профилактике и ликвидации нодулярного дерматита крупного рогатого скота – Источник информации: ИПС Эдилет. – [http://adilet.zan.kz/rus/docs/V040003341\\_](http://adilet.zan.kz/rus/docs/V040003341_).
- 10 Davies F.G. Lumpy skin disease of cattle: A growing problem in Africa and the Near East, 1991– <http://www.fao.org/3/u4900T0d.htm>



- 11 Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees) // 6th Ed, Office International Des Epizootics. – Paris. – 2010.
- 12 Gerrit J.V., Nel L.H. and Crowther J.R. Molecular Diagnostic PCR Handbook. IAEA, the Netherlands. – 2005.
- 13 Tuppurainen E.R., Afonse C.L., Zsak L.Z., Kutish G.F. and Rock D.L. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques // *Onder J Vet Res.* – 2005. – Vol.72. – P. 153-164.
- 14 Bowden T.R., Babiul S.L., Parkyn G.R., Copps J.S., Boyle D.B. Capripox virus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goat // *Virology.* – 2008. – Vol.371. – P.380-393.
- 15 Balinsky C.A., Delhon G., Smoliga G., Prarat M., French R.A., Geary S.J., Rock D.L., Rodriguez L.L. Rapid preclinical detection of sheep poxvirus by a real-time PCR assay // *J Clin Microbiol.* – 2008. – Vol.46. – P. 438–442.
- 16 Awad W.S., Ibrahim A.K., Mahran K., Farrah K.M. Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of lumpy skin disease in cows // *Trop Anim Health Prod.* – 2010. – Vol.42. – P.777-783.
- 17 Almezhanova M.D., Tlepov A.A., Shorayeva K.A., Burashev Ye.D., Mukhami N.N., Sultankulova K.T. Design of primers for diagnosing lumpy skin disease of cattle by PCR // *Al-farabi Kazakh National University Eurasian Journal of Ecology.* – 2019 – №2(60) – P.84-91.
- 18 Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction // *Methods Enzymol.* – 1987. – Vol.155. – P.335-350.
- 19 Mcpherson M.J., Ller S.G. PCR // *Bios Scientific Publishers.* – 2000. – P.288.
- 20 Innis M.A., Gelfand D.H. PCR Protocols: a guide to methods and applications // Chapter 1. Academic Press, San Diego, California. – 1990. – P.452.

### References

- 1 Mishchenko, A. V., Mishchenko, V. A., Shevkoplyas, V. N., Dzhailidi, G. A., Dresvyannikova, S. G., Chernykh, O.Yu., Kononov, A.V., Akbaev, R.M. «Ecologicheskie osobennosti nodulyarnogo dermatita krupnogo rogatogo skota». [“Ecological features of lumpy skin disease in cattle.”] *Veterinariya Kubani*, no. 5 (2017): 22. (In Russian).
- 2 Scientific opinion on lumpy skin disease. *EFSA Journal* 13, no.1 (2015): 3986.
- 3 Semakina, V.P., Zhiltsova, M.V., Savvin, A.V., Akimova T.P. «Rasprostranenie zaraznogo uzelkovogo dermatita (Nodulyarnogo dermatita) krupnogo rogatogo skota v mire». [“The spread of lumpy skin disease (Nodular dermatitis) in cattle in the world.”] *Veterinariya segodnya* 22, no. 3 (2017): 13. (In Russian).
- 4 Beard, P.M. “Lumpy skin disease: a direct threat to Europe”. *Vet. Ec.* 28 (2016): 557-558. DOI: 10.1136/vr.i2800.
- 5 Lumpy Skin Disease. *OIE Terrestrial Manual* 2.4.14, 2012.
- 6 *OIE-Terrestrial Animal Health Code* 2, 2016.
- 7 Pestova, Y.E., Artyukhova, E. E., Kostrova, E.E., Shumilova, I.N., Kononov, A.V., Sprygin, A.V. «Razrabotka PTSR v rezhime real'nogo vremeni dlya vviyavleniya polevyh izolyatov virusa zaraznogo uzelkovogo dermatita v probah ot krupnogo rogatogo skota». [“Real-time PCR development for detecting field isolates of the virus of lumpy skin disease in samples from cattle.”] *Sel'skohozyaistvennaya biologiya* 53, no. 2 (2018): 422-429. (In Russian).
- 8 *Rekommendatsii po bor'be s nodulyarnym dermatitom krupnogo rogatogo skota v Respublike Kazakhstan*. [Recommendations for combating lumpy skin disease in cattle in the Republic of Kazakhstan]. Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan Limited Liability Partnership Kazakh Research Veterinary Institute (LLP KazRVI), Almaty, 2017. (In Russian).
- 9 *Veterinarnye pravila osushtvleniya meropriyatii po profilaktike i likvidatsii nodulyarnogo dermatita krupnogo rogatogo skota*. [Veterinary rules for the implementation of measures for the prevention and elimination of lumpy skin disease in cattle]. Information source: IPS Adilet. <http://adilet.zan.kz/rus/docs/V040003341> (In Russian).
- 10 Davies, F. G. “Lumpy skin disease of cattle: A growing problem in Africa and the Near East» (1991) <http://www.fao.org/3/u4900T0d.htm>.
- 11 *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. 6<sup>th</sup> Ed. Paris: Office International Des Epizootics, 2010.
- 12 Gerrit, J.V., Nel, L.H., Crowther, J.R. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. IAEA. The Netherlands, 2005.
- 13 Tuppurainen, E.R., Afonse, C.L., Zsak, L.Z., Kutish, G.F., Rock, D.L. “The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques.” *Onder J Vet Res* 72 (2005): 153-164.
- 14 Bowden, T.R., Babiul, S.L., Parkyn, G.R., Copps, J.S., Boyle, D.B. “Capripox virus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goat.” *Virology* 371 (2008): 380-393.
- 15 Balinsky, C.A., Delhon, G., Smoliga, G., Prarat, M., French, R.A., Geary, S.J., Rock, D.L., Rodriguez, L.L. “Rapid preclinical detection of sheep poxvirus by a real-time PCR assay.” *J Clin Microbiol* 46 (2008): 438–442.
- 16 Awad, W.S., Ibrahim, A.K., Mahran, K., Farrah, K.M. “Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of lumpy skin disease in cows.” *Trop Anim Health Prod* 42 (2010): 777-783.
- 17 Almezhanova, M.D., Tlepov, A.A., Shorayeva, K.A., Burashev, Ye.D., Mukhami, N.N., Sultankulova, K.T. “Design of primers for diagnosing lumpy skin disease of cattle by PCR.” *Al-farabi Kazakh National University Eurasian Journal of Ecology* 2, no. 60 (2019): 84-91.
- 18 Mullis, K.B. and Faloona, F.A. “Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction.” *Methods Enzymol* 155 (1987): 335-350.
- 19 Mcpherson, M.J. and Ller, S.G. “PCR.” *Bios Scientific Publishers.*, 2000.
- 20 Innis, M.A., and Gelfand, D.H. “PCR Protocols: a guide to methods and applications.” San Diego, California *Academic Press* 1 (1990): 452.