

У капсулированных семян в лабораторных условиях всхожесть и энергия прорастания повысилась по сравнению с контролем. Однако по нашим наблюдениям энергия прорастания была не достаточно высокой, в связи с этим планируется введение состав капсулы стимуляторов роста. Интенсивность роста корешка у капсулированных семян значительно превышает рост корешка у контрольной партии семян. Это объясняется особенностью минерала используемого при капсулировании, который превращает почву в часть капсулы за счет величины почвенного поглощающего комплекса.

Поскольку в капсуле нет вредных для окружающей среды химических веществ, предложенный состав является экологически безвредным.

Литература

1. А.С.242589 (СССР) Кл 45, 5/00. Стимулятор роста растений / В.П. Лобов, М.О. Лозинский, Ю.В. Карабаев. – Оpubл. в И.Б., 1969, № 15.
2. Obroucheva, N.V. 1999. Seed germination. Backhuys Publishers, Leiden. pp. 1-8.
3. Смелик В.А., Кубеев Е.И. // ЗОЛОТАЯ НИВА. - №4. - 2003 г.
4. Vanangamudi K., Natarajan K., Saravanan T., Renuka R., Natarajan N., Umarani R., Bharati A. 2006. Seed hardening, pelleting, and coating. pp. 2-3
5. Kubota, M. Selective adsorption of bacterial cells onto zeolites / M. Kubota, T. Nakabayashi, Y. Ma-tsumoto et al. // Colloids and Surfaces B-Biointerfaces. – 2008. - №64. – P. 88-97.
6. *Concepcion-Rosabal, B.* Bactericidal action of Cuban natural clinoptilolite containing clusters and nanoparticles of silver / B. Concepcion-Rosabal, N. Bogdanchikova, I. De la Rosa et al. //Book of abstracts 7th International Conference on Углеводородные и минеральные ресурсы 1219the Occurrence, Properties, and Utilization of Natural Zeolites «Zeolite'06», 16-21 July 2006, Socorro, New Mexico, USA. – Socorro, 2006 – P. 88-90.
7. *Galeano, B.* Inactivation of vegetative cells, but not spores, of *Bacillus anthracis*, *B.cereus*, and *B.subtilis* on stainless steel surfaces coated with an antimicrobial silver- and zinc-containing zeolite formulation / B. Galeano, E. Korff, W.L. Nicholson // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. - №69. – P. 4329-4231.
8. *Kim, D.M.* Effect of zeolites on protein-synthesis in a cell-free system from *Escherichia Coli* / D.M. Kim, Y.E. Kim, C.Y. Choi // Biotechnology Letters. – 1995. - №17. – P. 1043-1046.
9. Патент № 2163062 Заявитель(и): Всероссийский научно-исследовательский и проектно-технологический институт рапса. Автор(ы): Колягин Ю.С., Драчев Н.А., Савенкова Л.М., Полякова Л.В.
10. *Grce, M.* Antiviral properties of clinoptilolite / M. Grce, K. Pavelic // Microporous and Mesoporous Materials. – 2005. – Vol. 79, Issues 1-3, №1. – P. 165-169.
11. Яковлева И.Г. Механизация изготовления и посева капсулирование семян сельскохозяйственных культур. - Фрунзе, 1977. - 64 с.
12. Патент № 2277315, Лужков Юрий Михайлович (RU); Ворожцов Георгий Николаевич (RU); Калиниченко Алла Николаевна. Капсула для проращивания и роста семян и способ ее получения. 2004.07.12.

Түйін

Бұл жұмыста ауылшарушылық топтама дәндерін капсулаудың компоненттік құрамы талқыланып, капсуланған рапс дәндерінің (*Brassica napus L.*) өз лабораториялық зерттеу нәтижелері ұсынылды. Алынған капсуланған дәндердің сипаттамалары беріліп, тұғым өнгіштігі мен өну энергиясы анықталды.

Summary

The paper discusses the component composition for pelleting seed crops are their own results of laboratory testing of rapeseed (*Brassica napus L.*), subjected to the encapsulation. Were given the characteristics of the seed drops, defined germination and seed vigor.

УДК 619:57.083.18:578.835.2

Карамендин К.О., Кыдырманов А.И., Жуматов К.Х., Саятов М.Х.
МУЛЬТИПЛЕКС ПЦР ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ
ДИАГНОСТИКИ ГРИППА А И БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА
РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, ecovir@nursat.kz

Грипп птиц и болезнь Ньюкасла - это наиболее контагиозные и опасные орто- и парамиксовирусные вирусные инфекции домашних и диких птиц, наносящие значительный урон экономике сельского хозяйства Казахстана [1].

Большей частью эти заболевания протекают в виде моноинфекции, но иногда возможны смешанные формы, которые могут возникнуть среди птиц после применения поливалентных живых вакцин в условиях тесного скученного содержания поголовья, а также при заносе нескольких инфекционных агентов извне [2].

Дифференциальная диагностика орто- и парамиксовирусных инфекций осложняется тем, что вызываемые ими клиническая картина и патологоанатомические изменения очень сходны. Применяемые в настоящее время традиционные методы диагностики – реакция торможения гемагглютинирующей активности и реакция диффузионной преципитации требуют культивирования вирусов на развивающихся куриных эмбрионах, что значительно увеличивает время и затраты на исследования [3]. Иммуноферментные коммерческие тест-системы менее чувствительны и специфичны, по сравнению с выделением возбудителя на эмбрионах. Для обнаружения и идентификации вирусов гриппа и болезни Ньюкасла в последние годы применяется метод ПЦР [4]. Несмотря на его преимущества, с помощью обычной ПЦР можно обнаружить только один инфекционный агент, в то время как мультиплекс ПЦР позволяет выявить несколько возбудителей в одной реакции, что значительно снижает стоимость диагностических процедур при сочетании высокой чувствительности и скорости анализа.

В связи с этим нами разработана мультиплексная ПЦР тест-система для одновременной дифференциальной диагностики орто- и парамиксовирусных инфекций в целях оптимизации контроля над распространением возбудителей этих опасных вирусных инфекций в Казахстане. В статье описываются результаты ее испытания.

Материалы и методы

Сбор полевых материалов, изоляция вирусов, восстановительные пассажи и получение биомассы вирусов выполнялись по методикам, рекомендованным ВОЗ [5].

В работе использовали казахстанские изоляты вируса гриппа А из коллекции лаборатории экологии вирусов Института микробиологии и вирусологии.

Клонирование вирусов проводили методом предельных разведений на 9-10 дневных развивающихся куриных эмбрионах.

Очистку и концентрацию вирусов осуществляли в градиенте плотности сахарозы (30%-60%) на центрифуге "Beckman" при 37000 об/мин, 90 мин.. Вирус собирали на границе раздела и ресуспендировали в минимальном объеме Трис-НСI буфера.

Выделение РНК проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hidden) в соответствии с рекомендациями производителя.

Комплементарные ДНК из РНК получали методом обратной транскрипции при помощи универсального праймера *uni-12* для вирусов гриппа А и случайных гексамерных праймеров (random hexamers) для вируса болезни Ньюкасла из набора First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas) согласно наставлений производителя.

ОТ-ПЦР проводили с одновременным использованием в одной реакции праймеров в установленной опытным путем концентрации: 0,5 микромоляр при одинаковых условиях ПЦР. Реакцию проводили в термоциклере при следующих условиях: начальная 2 мин денатурация при 95°C и амплификация в 30 циклов, включающая денатурацию (94°C, 30 сек), отжиг праймеров при 55°C в течение 30 сек и удлинение цепи (72°C, 30 сек) с последующей окончательной элонгацией при 72°C, 10 мин.

Секвенирование ДНК проводили в Национальной лаборатории биотехнологии коллективного пользования РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК с использованием терминирующих дидеоксинуклеотидов на автоматическом 96-капиллярном секвенаторе ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems).

Выравнивание секвенированных последовательностей генов вирусов гриппа А и болезни Ньюкасла с полными нуклеотидными последовательностями генов вирусов евразийских линий проводили с помощью компьютерной программы BioEdit.

Специфические праймеры к различным фрагментам консервативной последовательности генов вирусов конструировали с помощью компьютерной программы Primer Premier 5. Их тестирование выполняли при одинаковых концентрациях и условиях термоциклирования в мультиплекс ПЦР. Подбор оптимального режима для постановки мультиплекс - ПЦР проводили варьированием параметров температуры и времени. Реакцию ставили в термоциклере Eppendorf Gradient (Германия).

Электрофорез проводили в 2% растворе агарозы (Sigma, США) в трис-ацетатном буфере при напряжении 88V (8 вольт/см) на аппарате Biostep (Великобритания).

Результаты и обсуждение

На основе проведенного секвенирования сконструированы праймеры к фрагментам консервативной последовательности М генов вирусов гриппа А и болезни Ньюкасла, которые охватывают участки в 244 и 132 пар оснований соответственно.

Разработанная тест-система проверена с казахстанскими изолятами вирусов гриппа А различных подтипов: А/лошадь/Алматы/23/07 (H3N8), А/чирок-свиштунок/ЮКО/ 8045/08 (H3N8), А/белолобый гусь/Центральный Казахстан/3737/09 (H5N3), А/озерная чайка/Атырау/2185/07 (H11N2), А/черноголовый хохотун/Атырау/ 2912/08 (H13N6) и А/лысуха/Атырау/2221/07 (H16N3).

В результате реакции, представленной на рисунке 1, с праймерами к участкам М генов вирусов гриппа А, получены положительные результаты с обнаружением специфических продуктов в 244 пар оснований

Таблица 1 - Характеристики сконструированных праймеров к М генам вирусов гриппа А и болезни Ньюкасла

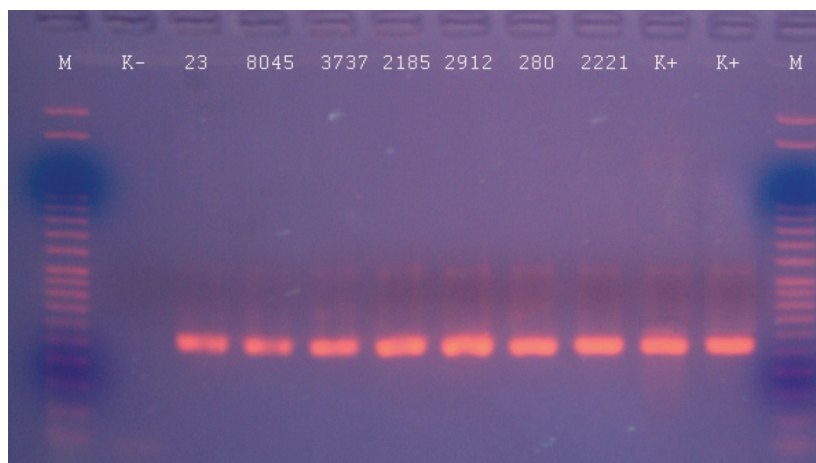
№	Обозначение	Направление	Последовательность, 5'-3'	Ожидаемый продукт
	primer_NDV_1	F	TACTTTGATTCTGCCCTHCC	132 п.о.
		R	CTTRCTGTCTGTCCACGA	
	primer_FLU-M_1	F	GCCCTAAATGGGAATGGA	244 п.о.
		R	GCCTGTGAGACCGATGCT	

Набор испытан и с эталонными штаммами вируса гриппа А: А/утка/Калифорния//72 (H3N8), А/утка/Чехословакия/1/56 (H4N6), А/крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3) и А/индюк/Массачусетс/3740/65 (H6N2).

При постановке реакции с эталонными штаммами вируса гриппа А также получены положительные результаты.

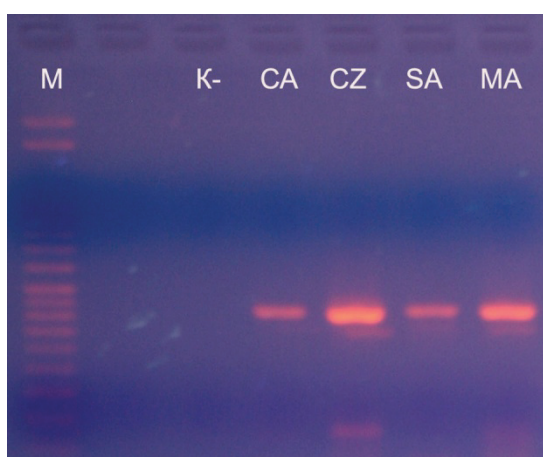
Чувствительность ПЦР набора определена и по отношению к казахстанским изолятам вируса болезни Ньюкасла и эталонному штамму La Sota с праймерами, которые охватывают участки геномов в 132 пар оснований. Используются изоляты вируса болезни Ньюкасла различных годов выделения: ПМВ-1/курица/Алматы/22/98, ПМВ-1/курица/Алматы/28/98, ПМВ-1/курица/Алматы/32/98, ПМВ-1/красноносый нырок/Коргалжын/3645/09, ПМВ-1/серый гусь/Коргалжын/3647/09, ПМВ-1/морской голубок/Коргалжын/3651/09, ПМВ-1/огарь/Коргалжын/3655/09 и эталонного штамма La Sota.

Выявление ожидаемых продуктов ПЦР в 132 п.о., представленных на рисунке 3, с вирусами болезни Ньюкасла (эталонного штамма La Sota и полевых изолятов). свидетельствуют о возможности использования ее в дальнейшем для одновременной молекулярной диагностики вирусов гриппа А и болезни Ньюкасла.



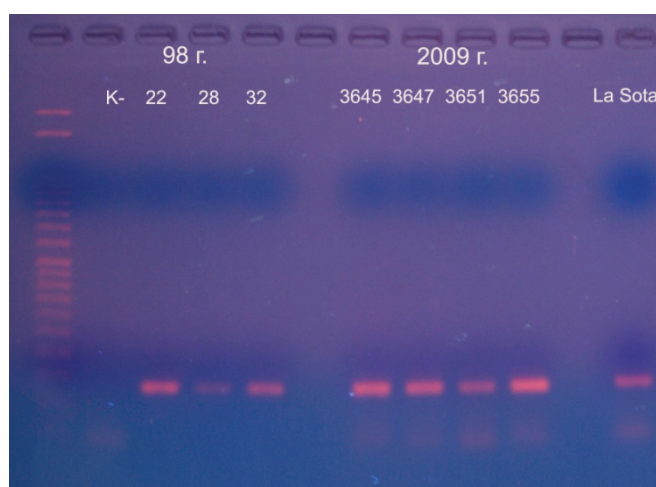
Примечание: М-маркер, К- и К+ - отрицательный и положительный контроли, 23, 8045 и др. - обозначения изолятов вирусов.

Рисунок 1 - Результаты испытания тест-системы с казахстанскими изолятами вируса гриппа А разных подтипов



Примечание: М-маркер, К- и К+ - отрицательный и положительный контроли, СА - А/утка/Калифорния//72 (H3N8) , CZ - А/утка/Чехословакия/1/56 (H4N6), SA - А/крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3), МА - А/индюк/Массачусетс/3740/65 (H6N2).

Рисунок 2 - Испытание тест-системы с эталонными штаммами вируса гриппа различных подтипов



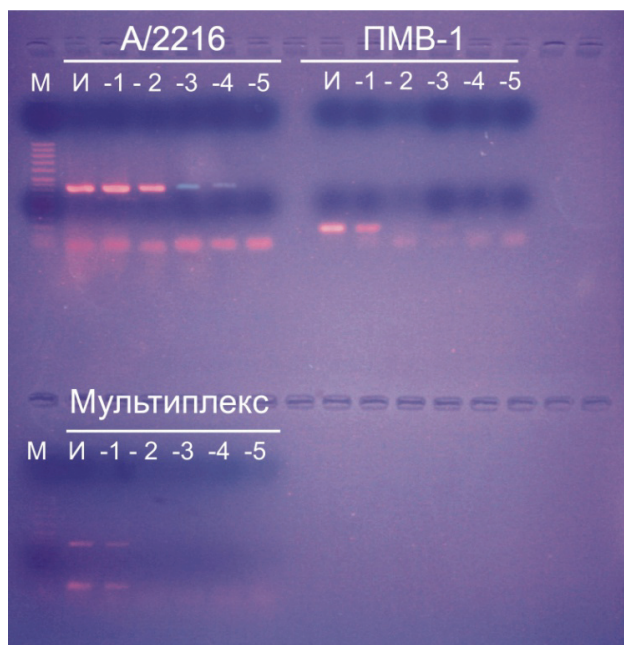
Примечание: М-маркер, К- отрицательный контроли, 22, 3645 и др. - обозначения изолятов вирусов.

Рисунок 3 - Результаты испытания тест-системы с лабораторными изолятами вируса болезни Ньюкасла и эталонным штаммом La Sota

Определение чувствительности набора

Набор испытан с десятикратными последовательными разведениями комплементарных ДНК начиная с неразведенной кДНК до 10^{-5} разведения. Исходная концентрация специфической кДНК вируса гриппа А/серебристая чайка/Аырау/2216/07 (H16N3) составила 3,3 мкг/мкл, концентрация общей кДНК вируса ПМВ-1/курица/ Алматы/32/98 – 1,98 мкг/мкл.

ПЦР ставили с набором Fermentas (Германия) с использованием всех последовательных разведений кДНК.



Примечание: М-маркер, А/2216, ПМВ-1- обозначения изолятов вирусов, И – исходная неразведенная кДНК, 10^{-1} и далее – разведения кДНК

Рисунок 4 - Результаты испытания чувствительности тест-системы с лабораторными изолятами вируса гриппа А и болезни Ньюкасла

Как видно из рисунка 4, отдельно с кДНК вируса гриппа А набор работает до 10^{-4} разведения, с кДНК вируса болезни Ньюкасла - до 10^{-1} разведения, в мультиплекс ПЦР также до 10^{-1} разведения, что сопоставимо с предъявляемыми требованиями к чувствительности ПЦР.

Изучение специфичности разработанного набора в условиях лаборатории с птичьими вирусами, принадлежащим к различным семействам

Для испытания специфичности ПЦР-набора тестировали его с птичьими вирусами, принадлежащими к различным семействам: *Віrnаvіrіdае* (вирус инфекционной бурсальной болезни птиц) и *Нересvіrіdае* (вирус инфекционного ларинготрахеита).

Таблица 2 - Результаты испытаний специфичности ПЦР-набора с гомологичными и гетерологичными вирусами

Вирус	Результат ПЦР
Вирус инфекционной бурсальной болезни (болезнь Гамборо)	—
Вирус инфекционного ларинготрахеита	—
Вирус гриппа птиц	+
Вирус болезни Ньюкасла	+

Как видно из результатов исследований, разработанная тест-система позволяет обнаружить РНК вирусов гриппа А и болезни Ньюкасла в одной реакции и не реагирует с гетерологичными вирусами, что свидетельствует о ее специфичности.

Литература

- 1 Саятов М.Х., Жуматов К.Х. Вирусы гриппа птиц и грипп А(Н5N1) у человека // Изв. МОН РК, НАН РК. Сер. биол. и мед. - 2005. - №2. - С. 3-9.
- 2 Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. and Saif Y.M. Diseases of poultry // Iowa State University Press. – 1997. - P. 541-570.
- 3 World Organisation For Animal Health (OIE) (2008). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/eng/normes/en_mmanual.htm.
- 4 Payungporn S., Phakdeewirot P., Chutinimitkul S. et al. Single-Step Multiplex Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Influenza A Virus Subtype H5N1 Detection// Viral Immunology. - 2004. - Vol. 17. – P. 588-593.
- 5 WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. WHO/20-02.5. - 2003. – P. 3

Түйін

Ерекше қазақстандық штамдар негізінде өңделген ПЦР тест-жүйе ветеринарлық вирусология және эпизоотология тәжірибесінде жабайы және үй құстарының А тұмауы мен Ньюкасл ауруына дифференциалды диагностикада қолдануға болады.

Summary

Developed based on the original Kazakh strains of PCR test-system can be used in practice for Veterinary Virology and epizootiology for differential diagnosis of outbreaks of influenza A and Newcastle disease in populations of wild and domestic birds.

УДК 579.64

Касымбекова С.С.

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ЗАЩИТНЫХ СРЕД ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ В КРИОКОНСЕРВИРОВАННОМ ВИДЕ

*Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан
somkas@inbox.ru*

Микроорганизмы являются одним из наиболее существенных компонентов биосферы. Создание и поддержание коллекции микроорганизмов играет чрезвычайно важную роль в исследовании микробного разнообразия, а также в сохранении в генетически стабильном виде продуцентов используемых в биотехнологических производствах, медицине и экологической биотехнологии [1].

Существует много методов длительного хранения бактерий, однако, не все штаммы при использовании какого-либо из них ведут себя одинаково. Выбор метода часто определяется наличием оборудования, места для хранения и квалифицированных сотрудников [2].

В основе всех методов консервации, предлагаемых на сегодняшний день, лежит перевод клеток в состояние анабиоза, что ведет к снижению или прекращению всех метаболических процессов. Распространенными и основополагающими методами длительного хранения микроорганизмов являются лиофильное высушивание и криоконсервация. Эти методы консервирования позволяют длительное время сохранять жизнеспособность и функциональную активность микроорганизмов. Однако есть и недостатки у этих методов, например, титр жизнеспособных клеток микроорганизмов в результате лиофилизации часто оказывается низким. Кроме того, многие неспорообразующие микроорганизмы не переносят обычно используемые режимы лиофилизации и не могут храниться этим методом. Так же известно, что у лиофилизированных культур гораздо чаще, чем у замороженных, наблюдаются генетические и морфологические изменения, повреждения ферментных систем, ДНК, нарушения проницаемости клеточных мембран. Поэтому многие авторы считают, что замораживание по сравнению с лиофильным высушиванием является более надежным методом хранения микробных культур [3, 4].