

конструкции сооружений на большие расходы принимаемых стоков. Полностью смонтированные системы могут быть доставлены любым видом транспорта к месту размещения и только трубные и электрические соединения будут необходимы, чтобы сделать их полностью работоспособными. В этих случаях работы по установке и расширению очистных установок могут быть выполнены быстро и с малыми затратами.

Таблица – Сравнение различных систем биологической обработки

| Сравнение аэрируемые поверхности | |
|--|---|
| Процессы обработки | Удельная площадь аэрируемой поверхности, м ² /м ³ |
| Капельный биофильтр | 3,6-9,2 |
| Вращающиеся биологические контакторы | 12,2-15,5 |
| Псевдооживленный слой | 244-365 |
| Концентрация удаленного БПК₅ | |
| Процесс обработки | Удаленное БПК ₅ , мгО ₂ /гАИ.сут |
| Активный ил на чистом кислороде | 2,5-6,0 |
| Активный ил на кислороде воздуха | 1,5-3,0 |
| Псевдооживленный слой | 18,0-38,0 |

Таким образом, применение псевдооживленного слоя для повышения качества очистки в аэротенке является перспективным направлением развития и совершенствования систем аэробной биологической очистки, обеспечивающим как повышение качества очистки, так и достижение высокой технико-экономической эффективности строительства и эксплуатации.

Список литературы

1. Денисов, А.А., Павлинова, И.И., Пронин, А.А. Гидродинамика и массопередача кислорода в многофазовом реакторе. II Всероссийская научно-практическая конференция «Окружающая среда и здоровье», г. Пенза, 2005, С. 82-83.
2. Жмур, Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. – М.: Акварос, 2003.
3. Жмур, Н.С. Управление процессом и контроль результата очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. – М.: Луч, 1997.
4. Шеломков, А.С., Захватаева, Н.В., Никифорова, Л.О. Дзета-потенциал активного ила как показатель его состояния // Проекты развития инфраструктуры города. Вып. 5. Моделирование и анализ объектов городских инженерных систем: Сб. научных трудов, МосводоканалНИИпроект. – М.: Прима-Пресс-М, 2005.
5. Activated sludge separation problems. Theory, Control Measures, Practical Experience /Scientific and Technical report №16, IWA Publishing, London – Seattle, 2006.
6. Kaimakamidou V., Yiannakopoulou T. Microbial community structure in the activated sludge process. 8 Int. Confer. on Environmental Science and Technology Lemnos Island, 8-10 September 2003.

APPLICATION OF LUIDIZED LAYER FOR THE IMPROVING OF WASTE WATERS PURIFICATION IN THE AEROTANK

Denisov A.A., Kadyseva A.A., Ganyayev A.M., Chichiyelishvili G.D., Bondyrev D.Ye., Kalistratov I.M., Mahrov S.V., Skrebnev Yu. V.
All Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry, Schelkovo, Moscow region

Advantages of use of the fluidized layer before filtration in the immersed biofilters and before active – sludge treatment in traditional aerotanks have been shown. In the three-phased layer there occurs increase of the real area of microorganism biofilm formation and raise of the speed of biochemical oxidation of contamination by attached microflora. Due to the raise of biomass concentration in the aeration facility there appears an opportunity to reduce the time of its stay and thus to reduce facility capacities.

УДК 619:616.98:578.821.21:636.52/.58:616-076

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ pGEMT4B В КАЧЕСТВЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВИРУСА ОСПЫ ПТИЦ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Елаткин Н.П., Дрыгин В.В.

ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир

Оспа птиц – вирусное заболевание домашних и диких птиц более чем 278 видов, которое в настоящее время распространено во многих странах мира с развитым птицеводством. Возбудителем оспы птиц является ДНК-содержащий эпителиотропный вирус рода *Aviroxvirus*, подсемейства *Chordoroxviridae*, семейства *Poxviridae*, где насчитывается 16 самостоятельных видов. Вирус оспы кур определен как типичный вид данного рода [5].

Вспышки оспы причиняют птицеводческим хозяйствам большой экономической ущерб, складывающийся из падежа и вынужденного убоя больных и переболевших птиц, снижения яйценоскости [2].

Для диагностики оспы птиц предложена ПЦР с праймерами на консервативную область гена P4b [4]. В результате одностадийной ПЦР специфично амплифицируется фрагмент кДНК длиной 578 п.н. Важной задачей при проведении ПЦР является наличие надежного и безопасного положительного контроля. Одним из возможных путей решения данной задачи является использование рекомбинантной плазмидной ДНК в качестве положительного контроля. Такой контроль безопасен и недорог при приготовлении, устойчив при хранении и применении, легко стандартизируется.

Целью работы было создание рекомбинантной плазмиды с интегрированной вставкой участка гена P4b вируса оспы птиц, а также оценка возможности её применения в качестве положительного контроля в диагностических тест-системах для выявления вируса оспы птиц методом ПЦР. Конструкция должна иметь последовательность консервативного участка генома вируса заведомо известного размера, перекрывающего область исследования в ПЦР.

Материалы и методы. В качестве вектора для клонирования была использована многокопийная плаزمиды pGEM-TEasy («Promega», США), в качестве носителя генетической конструкции – компетентные клетки авирулентного штамма *E. coli* XL-1 («Stratagene», США). Трансфор-

Розділ 2. Загальні питання та новітні методи в біотехнології

мацію компетентных клеток осуществляли методом электропорации с использованием мультипоратора Eppendorf («Eppendorf», Германия). Выделение плазмид осуществляли набором Gene JET Plasmid Miniprep Kit («Fermentas», Литва).

Для постановки полимеразной цепной реакции применяли генно-инженерные Taq-полимеразы GoTaq® Flexi DNA Polymerase («Promega», США) и полимеразу фирмы «Синтол» (Москва). Реакции проводили в амплификаторе BioRad PTC-220 («BioRad», США). В работе использовали штамм вируса оспы кур КЭМ-7 из коллекции ФГУ «ВНИИЗЖ». ПЦР в режиме реального времени проводили в амплификаторе Rotor-Gene 6000 («Corbet Research», Австралия) с использованием диагностических праймеров на участок гена P4b вируса оспы птиц. Визуализацию ПЦР ампликонов и плазмид проводили методом электрофореза в 1-2 % агарозном геле с окраской бромистым этидием.

Первичную нуклеотидную последовательность рекомбинантных плазмид определяли с использованием автоматического секвенатора ABI Prism 3100SX («Applied Biosystems», США). Для расчёта праймеров и анализа нуклеотидных последовательностей в работе использовали прикладные компьютерные программы OLIGO 6.65 («Molecular Biology Insights», США) и BioEdit 7.0.5.3 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit>).

В работе использовали общепринятые методы культивирования бактерий, выделения плазмид, а также ряд молекулярно-биологических методов (лигирование, трансфекция, получение клонов *E. coli*, пересаживание нуклеиновых кислот, рестрикция) с использованием следующих ферментов: T4 ДНК-лигаза («Promega», США), эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* («Fermentas», Литва) [3].

Результаты исследований. На первом этапе работы был накоплен и очищен ПЦР-продукт участка гена P4b размером 578 п.о. Лигирование ПЦР-продукта с вектором проводили *in vitro* по T-концам в области полилинкера плазмиды pGEMT Easy, при этом количественное соотношение вектор: вставка было принято 3:1 (рис.1).

Трансфекцию компетентных клеток штамма XL-1 осуществляли методом электропорации в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки после трансфекции высевали на чашки с плотным LB агаром, содержащим ампициллин. В качестве селективного маркера использовали X-GAL с индуктором IPTG. Через сутки проводили отбор клонов для скрининга. Из 42 полученных клонов для скрининга отобрали 5 колоний белого цвета, культивировали их в жидкой питательной среде SOB, из бактериальной культуры выделяли плазмидную ДНК. Скрининг плазмид на наличие целевой встройки проводили методом ПЦР с соответствующими специфическими праймерами на участок гена P4b. Все клоны плазмид содержали целевой ген.

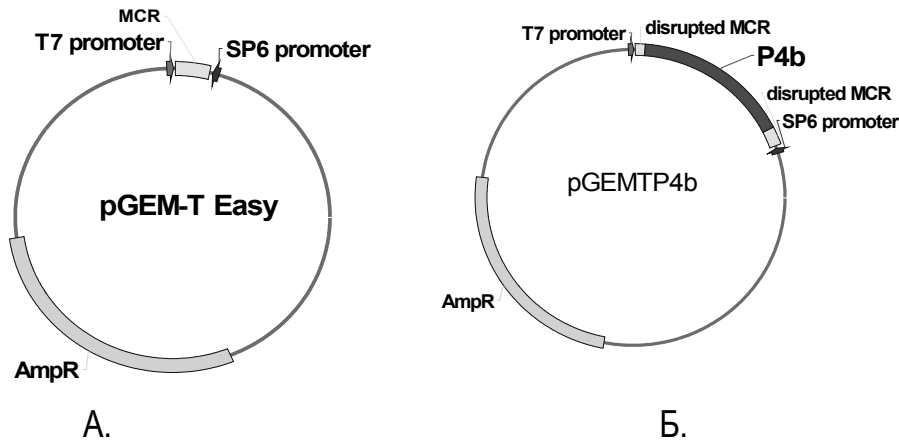


Рис. 1 Схема плазмиды pGEM-T Easy (А) и pGEMT4B (Б)

После этого полученные плазмиды секвенировали, с использованием праймеров на последовательности промоторов плазмиды (T7 – прямой праймер, SP6 – обратный). Полученные первичные последовательности анализировали. Определяли наличие нуклеотидных замен в гене и ориентацию вставки гена в плазмиде. Для дальнейшей работы был отобран клон плазмиды pGEM-T4B3, имеющий прямую ориентацию вставки и содержащий только одну нуклеотидную замену вне подпраймерной области.

Для анализа возможности использования рекомбинантной плазмиды, как положительного контроля в тест-системе для выявления ДНК вируса оспы птиц методом ПЦР, использовали в качестве матрицы отобранный клон плазмиды pGEMT4B3. Ранее исследованная аналитическая чувствительность метода ПЦР (рис. 2) с разведениями препарата вакцинного штамма КЭМ-7 вируса оспы кур (титр исходного препарата $10^{6,4}$ ИЭД₅₀/мл, составила $1:10^4$ - $1:10^5$ разведения исходного препарата (эквивалентно $10^{1,4}$ - $10^{2,4}$ ИЭД₅₀/мл, или 0,125 ИЭД₅₀/реакцию).

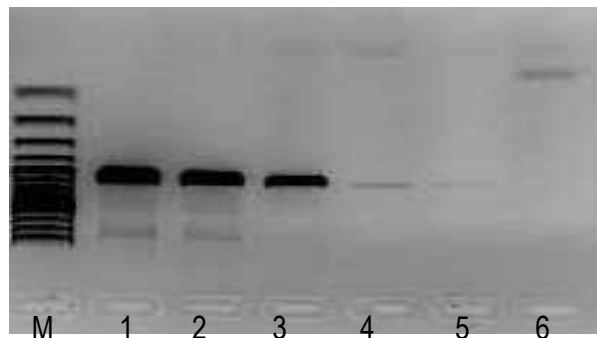


Рис. 2 Электрофореграмма результатов проверки аналитической чувствительности ПЦР с использованием в качестве матрицы вируса оспы кур штамма КЭМ-7.

М - Маркер ДНК (GeneRuler100bp Plus «Fermentas»), 1-5 – разведения препарата вакцинного штамма КЭМ-7 вируса оспы кур $10^{5,4}$ – $10^{1,4}$ ИЭД₅₀/мл, 6 – отрицательный контроль.

При использовании в качестве матрицы рекомбинантной плазмиды (начальная концентрация 131 нг/мкл), искомым ам-

плифицированный фрагмент выявили в разведении 1:10¹² (чувствительность при этом составляет приблизительно 8,1 копии/реакцию) (рис. 3) при использовании полимеразы GoTaq® Flexi DNA Polymerase («Promega», США) и в разведении 1:10¹¹ (чувствительность приблизительно 81 копии/реакцию) при использовании полимеразы фирмы «Синтол» (рис.3).

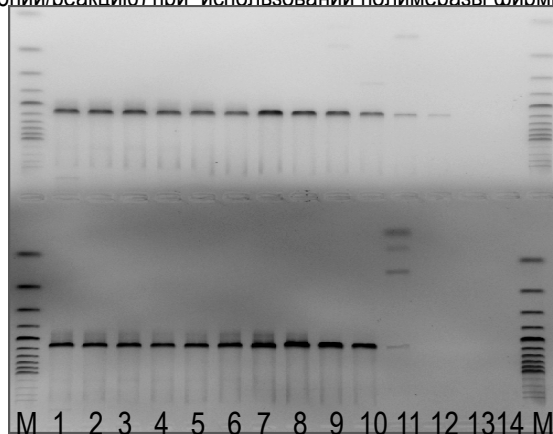


Рис. 3 Электрофореграмма результатов проверки чувствительности ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды рGEMT4B3.

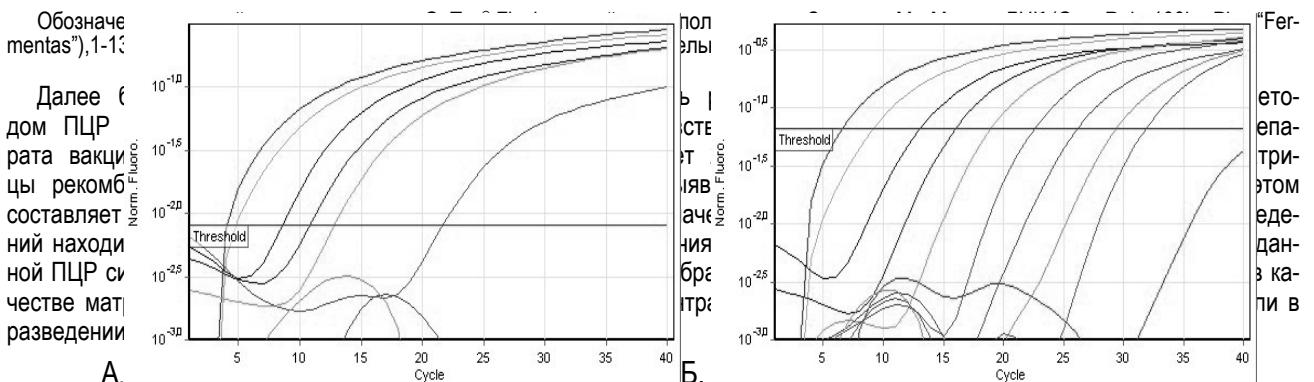


Рис. 4 Результат ПЦР в режиме реального времени на участок гена P4b: А – с разведениями нелиниаризованной рекомбинантной плазмиды 10⁻¹-10⁻⁷, Б – с разведениями линиаризованной рекомбинантной плазмиды 10⁻¹-10⁻¹⁰

Высокая чувствительность данных ПЦР-систем при использовании в качестве матрицы рекомбинантной плазмиды позволяет использовать в качестве положительного контроля минимальные количества плазмиды, что значительно удешевляет себестоимость такого контроля.

Многочисленные циклы замораживания-оттаивания ДНК вируса оспы птиц при использовании её в качестве положительного контроля в ПЦР, приводили к сильной деградации молекул ДНК. Плазмиды, напротив, выдерживали многократное замораживание-оттаивание, что также является одним из преимуществ применения в качестве положительного контроля ПЦР рекомбинантной плазмиды.

Выводы. В результате работы была получена рекомбинантная плазмиды рGEMT4B3 со встройкой участка гена P4b вируса оспы птиц. В ходе исследований была оценена специфичность связывания праймеров, входящих в тест-системы для детекции ДНК вируса оспы птиц, с нуклеотидной последовательностью сконструированной рекомбинантной плазмиды.

Перспективы дальнейших исследований. Полученный плазмидный вектор может с успехом применяться в качестве положительного контроля при проведении диагностических исследований. В виду своего небольшого размера, он устойчив при хранении, приготовление его безопасно, т.к. исключена работа с вирусным агентом.

Список литературы

1. Выявление генома вируса оспы птиц методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / Елаткин Н.П., Андрейчук Д.Б., Мудрак Н.С. [и др.] // Молекулярная диагностика – 2010. Сб. трудов VII Всероссийской науч.-практич. конф. с международным участием. – М.: Киселёва Н.В., 2010. –Т. 2. – С. 95-97.
2. Diversity, origins and virulence of avipoxviruses in Hawaiian forest birds / S.I. Jarvi, D. Triglia, A. Giannoulis [et al] // Conserv. Genet. – 2008. – Vol. 9, N 2. – P. 339-348.
3. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrooks, S. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – N.Y.: Cold Spring Harbor, – 2006. – 800 p.
4. Retention of 1.2 kbp of 'novel' genomic sequence in two European field isolates and some vaccine strains of Fowlpox virus extends open reading frame fpv241 / S.A. Jarmin, R. Manvell, R.E. Gough [et al] // J. Gen. Virol. – 2006. – Vol. 87, N12. – P. 3545-9.
5. Tripathy, D.N., Reed, W.M., 2008. Pox. In: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E. (Eds.), Diseases of Poultry. 12th ed. Blackwell Publishing Professional, Iowa, P. 291-307.

CREATING OF THE RECOMBINANT PLASMID VECTOR PGEMT4B AND USING THIS VECTOR LIKE THE POSITIVE CONTROL IN THE PCR FOR DETECTION FOWLPOX VIRUS

Elatkin N.P., Drygin V.V.

FGI "Federal Center for Animal Health" (FGI "ARRIAH"), Vladimir

The article describes the construction of a recombinant plasmid vector with a P4b gene insert of fowlpox virus. This vector could be used as a positive control in PCR for detection of fowlpox virus.