

**БЕЛОКОПИТОВА П.В., КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ Ю.М.,** д. т. н., проф.

## **УДОСКОНАЛЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ТИПУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ**

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це метод, що імітує природну реплікацію ДНК і дозволяє виявити єдину специфічну молекулу ДНК у присутності мільйонів інших молекул. Відкриття методу ПЛР стало однією з найбільш видатних подій в області молекулярної біології. Це дозволило підняти медичну діагностику на якісно новий рівень.

Генетичним, або ДНК-типуванням, називають визначення особливостей генотипу організму шляхом аналізу ДНК його геному. Визначення серотипу збудника представляє великий інтерес з точки зору епідеміології, можливості простежити епідеміологічний ланцюг передачі інфекції, а також виявлення зв'язку серотипу з клінічними проявами захворювання.

Об'єктом дослідження в цій роботі виступає *Chlamidia trachomatis*.

Для виділення ДНК до осаду додають 100 мкл реагенту Extragene - іонообмінна смола, яка містить одночасно і розчин, що лізирує, і адсорбент. Отриману суміш в термостаті гріють впродовж 30 хвилин при температурі 56°C – лізис клітин, потім 101°C 10 хвилин – сорбція ДНК на адсорбент. Після цього пробу центрифугують при 13000 об/хв. В надосадовій рідині міститься ДНК.

Зразок ДНК переноситься в пробірку, що містить ампліфікаційну суміш, що складається з води, ПЛР-буфера, розчину дНТФ, розчину праймерів і розчину Taq -полімерази (додається в суміш в останню чергу). Потім в кожную пробірку додається одна крапля мінерального масла для запобігання випару реакційної суміші в процесі ампліфікації. Потім проводили 45 циклів ампліфікація в автоматичному режимі. Отримані амплікони піддавали дії рестриктази Alu I ("СібЕнзим", Росія) для визначення поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів. Рестриктазу Alu I отримують з *Arthrobacter luteus*.

Ідентифікацію результатів проводили методом вертикального електрофорезу в 6%-му ПААГ. Приготування ПААГ на 10 мл розчину: 1М буфер (ТБЕ 2х) – 1,875 мл, акриламід (30%) – 2 мл, H<sub>2</sub>O<sub>дист.</sub> – 6,025мл, ТЕМЕД – 8 мкл, бромістий етидій – 2,5 мкл, персульфат амонію (20%) – 50 мкл.

Потім проводили окраску нітратом срібла для візуалізації результатів аналізу. Визначення молекулярної маси продуктів рестрикції проводили з використанням маркера молекулярної ваги, що відповідає фрагментам в діапазоні 50 – 500 п.н. з різницею 50 п.н. – М50.

В ході даної роботи провели ряд дослідів та вивчили розподіл генотипів *C. trachomatis*, виявлених у клінічних зразках від 42 хворих урогенітальним хламідіозом і виявили 10 генотипів *Chlamydia trachomatis*: F (n=14; 33,3%), E (n=8; 19%), G (n=7; 16,7%), B (n=6; 14,3%), J (n=2; 4,76% ), для I, D, K, Ba і H (n=1; 2,38%). Хоча загальний характер розподілу генотипів багато в чому подібний з описаними у Швеції і Голландії, в українській популяції виявлений ряд особливостей, що відрізняються від цих країн. В Україні значно частіше, чим в інших країнах, виявлялися хламідії, що відносяться до генотипів F, G і B.