

тной полимеразы phi29. Для получения фермента последовательность гена полимеразы phi29 длиной около 1700 нуклеотидов была оптимизирована для эффективной экспрессии в *E. coli* и части гена были собраны из набора синтетических олигонуклеотидов и лигированы *in vitro*. Полученный ген был клонирован в pGEM, а затем в вектор для экспрессии в *E. coli*. Были подобраны условия и режим для оптимальной работы полимеразы. Особенностью нашего набора по сравнению с аналогами является более высокая чувствительность, которая достигается за счет использования в качестве рассеянной затравки модифицированных тиофосфатной связью с 3' конца вырожденных девятичленных олигонуклеотидов, тогда как в прочих аналогичных системах используются модифицированные шестичленные вырожденные олигонуклеотиды.

В настоящий момент система проходит тестирование и в ближайшее время производство набора будет налажено на базе ФГУН ЦНИИЭ.

1. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification; Frank B. Dean et al., PNAS, vol.99, N8, p 5661-5266, 2002

2. Cell-free cloning using phi29 DNA polymerase, Clyde A. et al., PNAS, vol.102,N48,p. 17332-17336, 2005

АЛГОРИТМ ОПЕРАТИВНОЙ РАСШИФРОВКИ ВСПЫШЕК ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ НОВЕЙШИХ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Дедков В.Г., Маркелов М.Н., Шипулин Г.А.

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

В зависимости от уровня социально-экономического развития удельный вес смертности от инфекций варьирует от 5% в Европе до 62% в Африке. В целом в структуре причин смерти на инфекционные болезни приходится около 18,8% /1/.

В Российской Федерации ежегодно регистрируется 30-40 млн. случаев инфекционных болезней. Экономический ущерб из-за временной потери трудоспособности (или смерти) от инфекционных болезней постоянно растет. Так, например, в Российской Федерации в 2005 году экономический ущерб от гриппа и ОРВИ составил 120 млрд. рублей,

от прочих инфекционных болезней – 20 млрд. рублей, что почти в 2 раза больше, чем показатели за 2002 год /2/.

Важнейшими факторами, усиливающими эпидемиологическую и социально-экономическую значимость инфекционных болезней, являются тенденции развития хозяйственной деятельности человека.

Мировые интеграционные процессы и глобализация мировой экономики облегчают миграцию населения из слаборазвитых государств с низким уровнем санитарно-эпидемиологической защиты в развитые страны. В результате этого увеличивается вероятность возникновения вспышек инфекционных болезней, ранее не регистрируемых в странах, принимающих иммигрантов. Ситуация еще более усложняется в связи с бурным развитием международного туризма и экотуризма, которые сопровождаются вторжением в сбалансированные экосистемы, возникновением контактов с эндемичными животными и насекомыми, являющимися природными резервуарами ранее не известных вирусных инфекций.

Данные обстоятельства в совокупности с резкими социально-экономическими изменениями в Российской Федерации в последние годы не способствуют улучшению экологической и санитарно-эпидемиологической обстановки в стране. Наблюдается рост числа заболеваний неясной этиологии на фоне падения напряженности коллективного иммунитета, особенно в условиях высокой плотности населения в городских мегаполисах.

Санитарно-эпидемиологический надзор за инфекционными болезнями включает систему методов и средств их лабораторной диагностики. Быстрое и точное выявление и характеристика возбудителя инфекционных заболеваний – определяющий фактор для своевременного проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Современная лабораторная диагностика инфекционных заболеваний основана на использовании прямых методов выявления возбудителей, их антигенов или нуклеиновых кислот, а также непрямых методов, направленных на выявление специфических факторов гуморального и клеточного иммунитета. В ряде случаев сходные по первоначальной симптоматике, но существенно различающиеся по смертности и тяжести течения инфекционные болезни, вызываются разными инфекционными агентами и иногда одновременно несколькими патогенными микроорганизмами.

В настоящее время сформирован и начинает активно внедряться (в том числе и на базе ФГУН ЦНИИЭ) алгоритм быстрой расшифровки вспышек инфекционных заболеваний неясной этиологии, который позволяет, используя высокотехнологичные методы молекулярной

биологии в сжатые сроки определить первичные последовательности нуклеиновых кислот инфекционных агентов.

Эффективная работа алгоритма достигается путем выбора оптимального, в каждом конкретном случае, молекулярно-биологического метода в зависимости от количества инфекционных агентов – вероятных возбудителей вспышки.

В качестве методов, используемых в данном алгоритме, рассматривают:

- ПЦР в реальном времени в случае менее 30 потенциально возможных возбудителей

- Mass-Tag ПЦР в случае 30–40 потенциально возможных возбудителей, либо отрицательных результатов ПЦР в реальном времени.

Методика сочетает в себе технологии ПЦР и масс-спектрологии. На первом этапе происходит наработка ампликона с помощью пары праймеров меченных специальными масс-метками. На втором этапе происходит детекция меток в масс-спектрометре. Методика позволяет осуществлять детекцию 30 мишеней одновременно. Время проведения анализа, включая пробоподготовку, составляет 6 часов /3/.

- Гибридизационный анализ на ДНК-чипах с использованием различных платформ (например, платформы Agilent) в случае более 100 потенциально возможных возбудителей, либо отрицательных результатов Mass-Tag ПЦР.

Высокопроизводительный метод, позволяющий детектировать около 30 000 мишеней в одной реакции. Количество мишеней потенциально можно увеличить до 244 000. ДНК-чип представляет собой поверхность, на которую ковалентно «пришиваются» ДНК-зонды. Исходный образец после предварительной амплификации гибридизуется с ДНК-зондами на поверхности слайда, а, затем, с дендримерами для визуализации. Результаты гибридизации считываются при помощи специального сканера, после чего программа анализа изображений выдает результат. Время проведения анализа составляет около 14 часов /3/.

- Высокопроизводительное секвенирование, если другие методы не дают положительного результата.

В настоящее время существуют 3 платформы для высокопроизводительного секвенирования: ABI SOLID sequencing system, Roche 454 GS-FLX platform, Illumina Solexa 1G Genome Analyzer. Данные платформы обладают возможностью одновременно генерировать миллионы считываний (sequence reads), что позволяет секвенировать бактериальный геном за несколько часов, а геномы эукариот – за несколько дней. Более того, традиционное клонирование в вектора, типичное для капиллярного секвенирования, заменено фрагменти-

рованием и последующей амплификацией суммарной ДНК. Другой особенностью данных технологий является сравнительно небольшая длина расшифровываемой в каждом считывании последовательности: 30 – 400 пар нуклеотидов. В качестве матриц для секвенирования используются пулы фрагментов ДНК, полученные с помощью ПЦР. Время проведения анализа составляет 7-10 дней.

Следует отметить, что реализация данного алгоритма стала возможной благодаря накопленной информации о первичных последовательностях нуклеиновых кислот, развитию биоинформационных методов и инструментальной базы.

Литература.

1. Медицинская вирусология: Руководство. Под ред. Д.К. Львова. Москва. Медицинское информационное агентство. 2008. ISBN 5-89481-564-9. Роль вирусов в инфекционной патологии человека. Стр.29-42.

2. И.Л. Шаханина, Е.П. Игонина, Н.И. Брико. Смертность от инфекционных болезней в различных регионах мира.// Эпидемиология и инфекционные болезни, №3, 2006, стр. 59-61.

3. Yaddanapudi K, Palacios G, Towner JS, Nichol ST, Sariol C, Lipkin WI "Implication of a retrovirus-like glycoprotein peptide in the immunopathogenesis of Ebola and Marburg viruses" *FASEB* 20 2519 2006

ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИИ ГЛАУКОНИТОМ МОЛЕКУЛ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Дмитриев П.А., Волков М.Ю.

Военная академия войск РХБ защиты и инженерных войск, Кострома, Россия

Значительный интерес для конструирования биопрепаратов на основе адсорбентов представляет изучение адсорбционных свойств клиноптилолита-глауконита к белковым веществам.

Нами проведена работа по изучению сорбционных свойств глауконита по отношению к макромолекулам белковых веществ в динамическом режиме на глауконитовых колонках с последующей регенерацией использованного глауконита для многократного пользования.

В работе исследована адсорбция альбумина (бычьей сыворотки, $M=68000$) из 10%-го водно-спиртового раствора (концентрация альбумина 100 мг/л) природным глауконитом и его водными формами. Установлены рентабельный сорбент (глауконит, обработанный 0,5н HCl) и некоторые параметры проведения адсорбции (скорость про-