

**ВПЛИВ ПРОЦЕСУ ПРЯМОГО ЕКСТРАГУВАННЯ ОБ'ЄКТІВ
ДОСЛІДЖЕННЯ БУФЕРНОЮ РІДИНОЮ PSA-ТЕСТІВ НА
ПОДАЛЬШЕ ПРОВЕДЕННЯ РЕАКЦІЇ АМПЛІФІКАЦІЇ З
ВИКОРИСТАННЯМ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ПЛР
AMPFLSTR IDENTIFILER PLUS**

Р. Антипов, здобувач вищої освіти

М. Гиль, д-р с.-г. наук, проф., акад. НАН ВО України

Миколаївський національний аграрний університет

Розглянуто питання доцільності, актуальності застосування буферної рідини за умов використання PSA-тестів в оцінюванні біологічного матеріалу Homo sapiens. Досліджено якість проведення ампліфікації ДНК з використанням набору реагентів AmpFlSTR Identifier Plus для ПЛР в умовах сертифікованої лабораторії обласного центру Миколаєва.

Ключові слова: буферна рідина, якість, PSA-тест, ПЛР, реагент, ДНК

Вступ

На даний момент у криміналістиці при проведенні судових біологічних експертиз, що стосуються розкриття злочинів скоєних на статевому підґрунті, широкого застосування набули експрес-тести виявлення простатспецифічного гормону, що міститься в сім'яній рідині.

Огляд літератури

Використання даного методу, як доказового методу наявності сім'яної рідини при проведенні досліджень беззаперечно скорочує терміни проведення досліджень та виключає випадки хибного результату при проведенні мікроскопічного дослідження препаратів виготовлених з об'єктів, що містять на собі сліди сперми у випадку аспермії [4]. Проте відсутність відомостей, щодо впливу екстрагування буферною рідиною (що входить до комплекту PSA-тестів) біологічного матеріалу на подальше проведення реакції ампліфікації з використанням набору реагентів для ПЛР AmpFlSTR Identifier Plus спонукало провести дослідження в даному напрямку.

Мета: Перевірити вплив процесу екстрагування об'єктів дослідження буферною рідиною PSA-тестів на стан біологічного матеріалу та подальше проведення реакції ампліфікації.

Завдання: Дослідити як впливає буферна рідина PSA-тестів при проведенні екстрагування об'єктів, що містять сім'яну рідину та біологічний матеріал, а саме – чи існує безпосередній вплив на структуру ядерної ДНК в аспекті проведення полімеразно-ланцюгової реакції з подальшим проведенням капілярного електрофорезу з метою дослідження STR-локусів.

Об'єкт: сперма людини.

Матеріал та методики

Дослідження проводили у відповідності до методик та інструкцій [1-3]:

- проведено дослідження сперми чотирьох чоловіків;
- екстракцію кожного об'єкту, для подальшого встановлення наявності сперми з використанням експрес-тестів STRATEC PSA SEMIQUANT, виконали бідистильованою деіонізованою водою та буфером у двох повторях;
- кількісну та якісну оцінку виділеної ДНК проводили використанням набору реагентів для ПЛР Quantifiler Human;
- проведення реакції ампліфікації з використанням набору реагентів для ПЛР AmpFlSTR Identifiler Plus.

Засоби виміральної техніки, випробувальне та допоміжне обладнання:

- дозатори (Eppendorf netheler hinz GmbH);
- мікроцентрифуга (Eppendorf Mini Spin);
- вортек (V-3);
- термошейкер (Biosan TS-100);
- термостат (Biosan CH-100);
- ламінарна шафа (Telstar Bio-II-A);
- Real Time 7300 PCR Systems фірми "Applied Biosystems" (США);
- ампліфікатор (PCR System 9700);
- 3130 AB - Genetic Analyzer фірми "Applied Biosystems" (США).

Для проведення досліджень взято еякулят чотирьох різних чоловіків на марлевих серветках з яких зроблено вирізки та поміщено до пробірок з метою подальшого застосування експрес-тесту STRATEC PSA SEMIQUANT.

Екстрагування проводили відповідно до інструкції виробника та методичних рекомендацій. Екстракцію біологічного матеріалу проводили паралельно буферною рідиною та бідистильованою деіонізованою водою. Серію проб взято в двох повторях.

Результати та обговорення

При проведенні екстрагування дослідного матеріалу бідистильованою деіонізованою водою під час проведення експрес-тестів STRATEC PSA SEMIQUANT на предмет наявності сім'яної рідини було отримано позитивний результат: у тестовому вікні (рис. 1) з'явилося три чіткі смуги (смуга результату-Т, смуга внутрішнього стандарту і смуга контролю-С).



Рис. 1. Екстрагування дослідного матеріалу бідиствильованою деіонізованою водою

При проведенні повторення екстрагування дослідного матеріалу буферною рідиною під час проведення експрес-тестів STRATEC PSA SEMIQUANT на предмет наявності сім'яної рідини було отримано позитивний результат: у тестовому вікні (рис. 2.) з'явилося три чіткі смуги (смуга результату-Т, смуга внутрішнього стандарту і смуга контролю-С).



Рис. 2. Екстрагування дослідного матеріалу буферною рідиною

Отже, суттєвого впливу на достовірність самого результату застосування експрес-тесту не виявлено.

Виділена ДНК підлягала кількісній та якісній оцінці з використанням набору реагентів для ПЛР Quantifiler Human, після чого було проведено нормалізацію її концентрації відповідно до рекомендованої виробником процедури для проведення ПЛР з використанням набору реагентів для полімеразно-ланцюгової реакції AmpF1STR Identifiler Plus та подальшого фрагментарного аналізу STR-локусів на автоматичному аналізаторі 3130 Genetic Analyzer.

При дослідженні усіх проб було отримано повний та якісний ДНК-профіль (рис. 3-4).

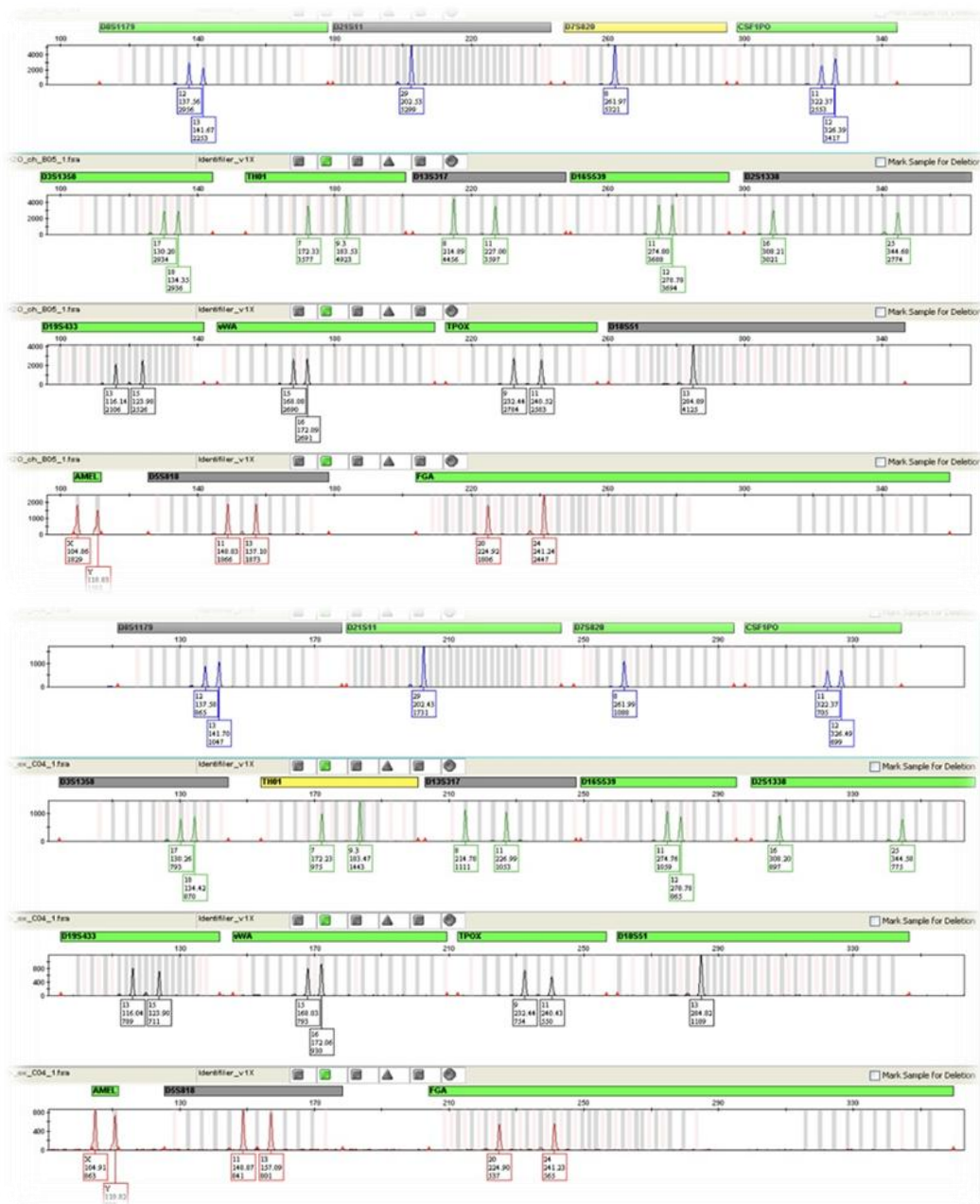


Рис. 3-4. Фрагментарний аналіз STR-локусів

При цьому важливо відмітити, що гетерозиготний баланс у так званих «важких локусах», тобто STR-локусах, що характеризуються найбільшою структурною довжиною (кількістю тандемних повторів нуклеотидних послідовностей) та є найменш стійкими та стабільними під дією фізичних чи хімічних чинників, становить більше 90% (рис. 5).

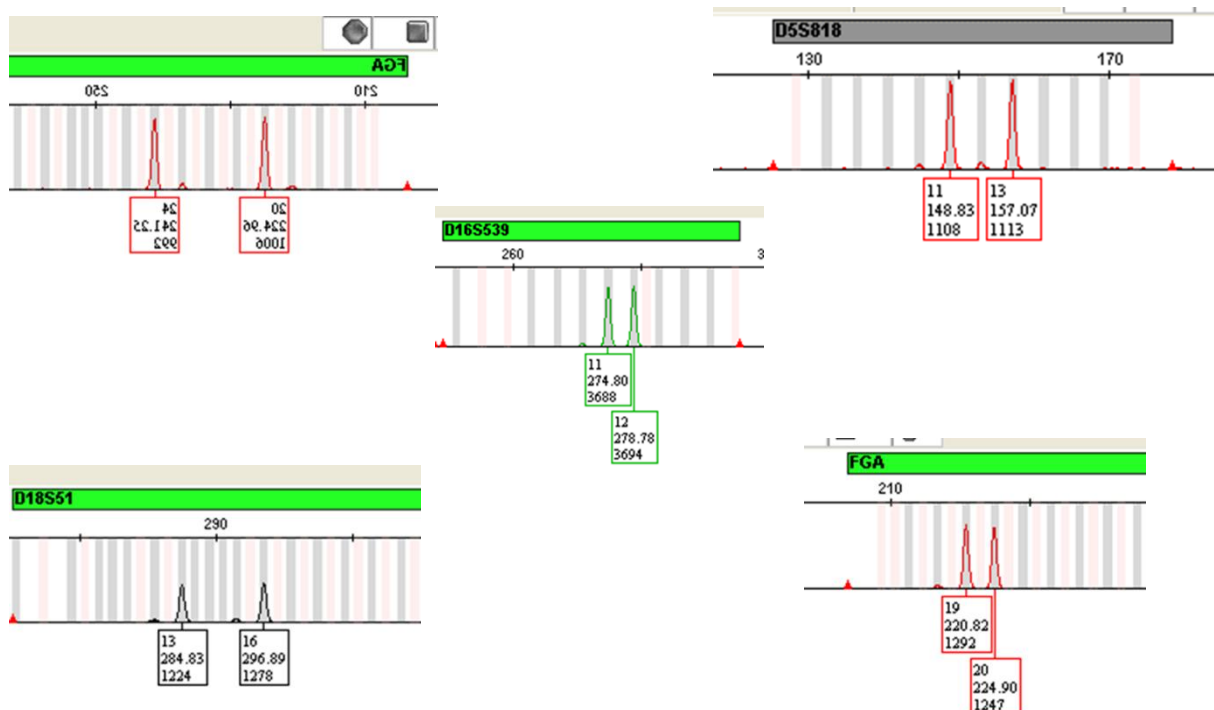


Рис. 5. Гетерозиготний баланс у так званих «важких локусах»

Отже, на підставі повторюваності проведених досліджень різних об'єктів та їх повноцінності за результатом, можна стверджувати про відсутність впливу буферної рідини на структуру молекули ДНК.

Висновки

1. Використання прямого екстрагування буферною рідиною біологічного матеріалу при застосуванні імунохроматографічного тесту для визначення наявності простат-специфічного антигену у пробному матеріалі з застосуванням експрес-тестів STRATEC PSA SEMIQUANT не впливає на проведення реакції ампліфікації з подальшим фрагментарним аналізом STR-локусів з використанням набору реагентів для полімеразно-ланцюгової реакції AmpFlSTR Identifiler Plus на автоматичному аналізаторі 3130 Genetic Analyzer та подальшу інтерпретацію результатів при проведенні судових молекулярно-генетичних експертиз.

2. Екстрагування бідицильованою деіонізованою водою біологічного матеріалу для подальшого проведення експрес-тестів STRATEC PSA SEMIQUANT на предмет наявності сім'яної рідини не впливає на достовірність результату самого тесту.

Список використаних джерел

1. Dadi, M., and Yasir, M. (2022) Spectroscopy and spectrophotometry: principles and applications for colorimetric and related other analysis. Colorimetry. Intech Open. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.101106>.
2. Das, P.M., Ramachandran, K., van Wert, J. and Singal, R. (2004) Chromatin immunoprecipitation assay. Biotechniques, 37, pp.961–969.
3. Song, C., Zhang, S., Huang, H. (2015) Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. Front Microbiol, 6, 129 a1049. Available at: doi: 10.3389/fmicb.2015.01049. PMID: 26483774; PMCID: PMC4588119.
4. Сиволоб, А. (2023) Молекулярна біологія: підручник. Київ: ВПЦ «Київський університет».

УДК:636.7:636.09:615.254.7

ДІАГНОСТИКА ТА ЛІКУВАННЯ СЕЧОКАМ'ЯНОЇ ХВОРОБИ У СОБАК

Б. Вагін, здобувач вищої освіти

А. Іовенко, канд. вет. наук, доцент

Миколаївський національний аграрний університет

У статті наведені оглядові дані щодо діагностики та лікування сечокам'яної хвороби у собак. Також розглядаються основні клінічні ознаки хвороби та хірургічний метод метод лікування, а також профілактика хвороби.

Ключові слова: сечокам'яна хвороба, собака, цистотомія, лікування

Вступ

Сечокам'яна хвороба – це стан, який виникає, коли в сечовивідних шляхах утворюються кристали, що спричиняє утворення каменів. Ці камені складаються з таких мінералів, як фосфати, оксалати, урати, цистин, карбонати та кремнезем. Класифікація уролітів на чотири типи мінералів, таких як урат, цистин, фосфат магнію, амонію та кальцію [1].

Огляд літератури

Клінічні ознаки сечокам'яної хвороби включають гематурію, полакіурію, странгурію та дизурію, хоча ці симптоми також можуть свідчити про інші захворювання нижніх сечових шляхів. Великі уроліти потенційно можуть спричинити обструкцію сечового міхура, тоді як камені меншого розміру можуть потрапити в уретру та застрягти, що призведе до закупорки. Собаки з обструкцією сечовивідних шляхів зазвичай намагаються помочитися без сечовипускання або з виділенням мінімальної кількості сечі [1].