

VIENO MĖGINTUVĖLIO ATVIRKŠTINĖS TRANSKRIPCIJOS LIZDINĖS POLIMERAZĖS GRANDININĖS REAKCIJOS (AT-PGR) PANAUDOJIMAS GREITAM PESTIVIRUSŲ NUSTATYMOUI IR DIFERENCIJAVIMUI

Arūnas Stankevičius^{1,2}, Algirdas Šalomska², Violeta Mockeliūnienė², Marija Stankevičienė³, Juozas Pieškus¹

¹*Imunologijos institutas, Molėtų pl. 29, 2021 Vilnius, tel. 8-22 469249*

²*Lietuvos veterinarijos institutas, Instituto g. 2, 4230 Kaišiadorys, tel. 8 346 60691; el. paštas: arusta@one.lt*

³*Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, 3022 Kaunas.*

Santrauka. Vieno mėgintuvėlio lizdinė AT-PGR buvo pritaikyta greitam galvijų virusinės diarėjos viruso (GVDV) ir klasikinio kiaulių maro viruso (KKMV) nustatymui ir diferencijavimui. Šių tyrimų tikslas - išbandyti supaprastintą atvirkštinės transkripcijos lizdinę polimerazės grandininę reakciją (AT lizdinė PGR) GVDV ir KKMV diagnostikoje. Šiam tikslui bendra RNR buvo išskirta iš virusais užkrėstų ląstelių kultūrų ir iš viso EDTA stabilizuoto kraujo. Penki mikrolitrai RNR buvo transkribuoti ir amplifikuoti dviem metodais: standartiniu, trijų etapų ir modifikuotu vieno uždaro mėgintuvėlio. Kiekvienam metodui buvo panaudoti du oligonukleotidų rinkiniai. Pirmasis buvo specifiškas visiems pestivirusams ir komplementarus 5'-UTR pestivirusų genomo regionui. Antrasis, sudarytas iš E2 proteiną koduojančios regiono nukleotidų sekų, buvo naudojamas diferencijuoti KKMV nuo GVDV. Standartinis metodas, susidedantis iš trijų etapų, atliktas 3 skirtinguose mėgintuvėliuose: AT, PGRI ir lizdinė PGR. Vieno mėgintuvėlio lizdinės PGR visi trys etapai buvo atliekami uždarytame mėgintuvėlyje. Šiam metodui AT-PGRI reagentai buvo sudedami į mėgintuvėlio dugną, tuo tarpu lizdinės PGR komponentai imobilizuojami mėgintuvėlio dangtelyje, panaudojant polisacharidą trehalozę. Užbaigus AT-PGRI etapą, mėgintuvėlis buvo keletą kartų pavartomas, trumpai nucentrifuguojamas ir toliau atliekama lizdinė PGR. Tyrimai įrodė, kad vieno uždaro mėgintuvėlio AT lizdinės PGR metodas buvo labai jautrus ir mažiau linkęs į klaidingai teigiamus tyrimų rezultatus, lyginant su standartinė AT lizdine PGR arba AT-PGRI. Šis metodas galėtų pagerinti jau egzistuojančias AT-PGR nustatant GVDV ar KKMV.

Raktažodžiai: pestivirusai, AT lizdinė PGR, GVDV, KKMV.