**Современные методы диагностики патогенных микроорганизмов при помощи LAMP/RT LAMP**

***Черепушкина В.С.1,2***

*студент*

Научный руководитель: Афонюшкин Василий Николаевич, ***к***анд. биол. наук, заведующий сектором молекулярной биологии2

1Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

2Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН Новосибирск, Россия

E-mail: vicky88@bk.ru

Петлевая изотермическая амплификация(LAMP) – Это техника [амплификации](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BC%D0%BF%D0%BB%D0%B8%D1%84%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%28%D0%BC%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8F%D1%80%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F%29) [ДНК](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A) и РНК в одной пробирке Метод LAMP позволяет проводить молекулярную диагностику существенно дешевле и быстрее, по сравнению с [ПЦР](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D1%86%D0%B5%D0%BF%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F). При диагностике РНК - вирусов метод LAMP позволяет проводить обратную транскрипцию и амплификацию одновременно. Оригинальный протокол метода LAMP был предложен японскими учеными 20 лет назад. Он заключался в использовании для амплификации ДНК четырех олигонуклеотидных праймеров и большого фрагмента Bst ДНК-полимеразы, обладающего сильной вытесняющей активностью. Таким методом можно определять патогенные микроорганизмы. [1,3]

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе СФНЦА РАН ИЭВС и ДВ и ИХБХФМ СО РАН. Полученные образцы клоакальных смывов предварительно обогатили в питательной среде (RVS) бульон, для наработки сальмонеллы соблюдая правило асептики. Инкубация проводилась при температуре 37- 41оС 16 часов.

Выделение ДНК- после инкубации из пробирки нужно отобрать 100 мкл культуральной жидкости в нести к ним 300 мкл лизирующего раствора (А1 ) тщательно перемешать инкубировать при 56оС в течение 5-10 мин и центрифугировать при 10-12тыс. об/мин в течение 3 мин. Надосадочную жидкость перенести в другие пробирки и туда же внести по 20 мкл ДНК сорбента (silica). Пробы тщательно перемешиваются и инкубируются 5 мин. Центрифугировать 5тыс. об/мин в течение 1 мин. Надосадочную жидкость слить, сорбент промыть буфером для отмывки (А2 ) 300мкл однократно и буфером (А3) 500мкл двух кратно. ДНК высушить при 50- 60оС. Хранить при температуре 18оС. В высушенном виде. Для провидения реакции ДНК следует илюировать 50 мкл ТЕ – буфера при 56 оС 5 мин. Центрифугировать 1 мин. 5 тыс. об/ мин. [6]

В процессе реакции LAMP/RT-LAMP применяется ДНК полимераза и три пары праймеров bcfD F3: ccggacaaacgattctggta, B3: ccgacatcggcattatccg, FIP: tgcfctttaccggtacgctgaatacagcggcaatttcaacca,BIP:cggtctggattcgcaggtcaaagcgatagcctggggaac, LF:taccccctccggcttttg,LB: acaatgcgtcttatcgctacg. Мишень праймеры F3 и B3. FIP и BIP Необходимы для формирования петлевых участков .LF и LB предназначены для повышения эффективности амплификации.

Протокол амплификации LAMP/RT-LAMP.В пробирки эппендофа вносим ДНК в объеме 5 мкл, а с внутренней стороны крышки вносим микрокаплю (1,5 мкл)SYBR-Green1 (100x раствор). В отдельном эппендорфе готовим реакционную смесь R1 в расчете на 1 пробу 7 мкл (смесь праймеров) + Буфер для LAMP/RT-LAMP R2 в расчете на 1 пробу 10 мкл + ДНК полимераза 0,5 мкл . Вносим готовую смесь к раскопанной ДНК по 18 мкл смеси вносим масло масло для ПЦР по 1 капле .Инкубируем в термостате при 64оС 2 часа. После инкубации в реакционну смесь вносят краситель SYBR-Green1 путем центрифугирования пробирок 1 тыс. об/мин. 20-30 сек. Пробирки следует поместить в трансиллюминатор в горизонтальном и в вертикальном положении. Для поведения анализа мы использовали программное обеспечение Image Lab “ Bio-Red” рансиллюминатор Gel Doc XR , синий конверсионный экран и зеленый светофильтр (при использовании нтеркалируюшего красителя SYBR-Green1).

Результаты собственных исследований.

Таблица 1 – Результаты диагностики патогенных микроорганизмов при помощи LAMP/RT-LAMP на наличие бактериальной ДНК*Salmonella enterica*

|  |  |
| --- | --- |
| № п/п |  Результат флюометрии Salmonella enterica |
| 1 | Отрицательно  |
| 2 | Положительно |
| 3 | Положительно |
| 4 | Положительно |
| 5 | Положительно |
| 6 | Положительно |
| 7 | Положительно |
| 8 | Отрицательно |
| 9 | Положительно |
| 10 | Положительно |
| 11 | Положительно |
| 12 | Положительно |
| 13 | Положительно |
| 14 | Положительно |
| 15 | Положительно |
| 16 | Положительно |
| 17 | Положительно |
| 18 | Положительно |
| 19 | Положительно |
| К- | *E. coli* |
| К- | *P.vulgaris* |
| К+ | *Salmonella enterica* |
| К+ | *Salmonella enterica* |
| К- | *P. aeruginosa* |

Преимуществом данного метода LAMP/RT-LAMP диагностики и поиску патогенных штаммов (сальмонелла, кишечная палочка и др.) на производственных предприятиях, не оспорим тем, что это более дешевый метод диагностики по сравнению с классическим методом ПЦР. Можно провести, не имея амплификатора для ПЦР просто заменить его на термостат, который есть в каждой лаборатории на производстве. Приобрести только нужные реагенты для самой реакции праймеры и буфер. Это позволит наиболее быстро определить в экстренных ситуациях, когда срочно нужна диагностика по поиску потаенных микроорганизмов.

**Список литературы**

1. Zhuang Е., Gong о., U Q., Zhu С., Уи У., Dou Х., Ии Х., Хи В., wang С. Detection of Salmonella spp. by а loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting bcfD gene Lett. Арр|. Microbiol. - 2014. - Vol. 59. - но. 6. - Р. 658-664.
2. Davis M. A, Hancock D. D., Besser T. E. Multiresistant clones of Salmonella enterica: the importance of dissemination // J. Lab. Clin. Med. - 2002. - Vol. 140. No. 3. - P. 135-141. doi: 10.1067/mlc.2002.126411.
3. Martin L. J., Fyfe M., Doré K., et al. Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant Salmonella enterica serotype Typhimurium infections // J. Infect. Dis. - 2004. - Vol. 189. - No. 3. R 377-384. doi: 10.1086/381270.
4. Продовольственное сырье и пищевые продукты. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности продуктов . СанПин 2.3.2.1078-01, Приложение 1. Москва, Минздрав Россия , 2002.
5. Афонюшкин В. Н., Черепушкина В. С., Миронова Т.Е., Хоменко Ю.С.,Давыдова Н.В. Коптев В.Ю., Балыбена Н.Ю., Филипенко М.Л.,КозловаЮ.Н.,Флолова О.А.,ХрепкоЮ.И//.Методические рекомендации « Анализ клинически значемых компонентов микробиома и вирома кишечника птиц современными методами молекулярной биологии Новосибирск 2019г