

Azərbaycan Respublikası Prezidenti

Yanında Elmin İnkişaf Fonduna

Zeynalova Şəlalə Kərəm q.

tərəfindən

HESABAT

Elmin İnkişaf Fondunun keçirdiyi 1-ci Mobillik qrant müsabiqəsində udduğum qrant hesabına, 7-17 may 2013 il tarixində Böyük Britaniyanın OIE üzrə Quduzluq İstinad laboratoriyası, Heyvan Sağlamlığı və Baytarlıq Laboratoriyaları Agentliyi, AHVLA-da 2 həftəlik təcrübə aparmışam.

Məqsəd: Azərbaycandan gətirilmiş 15 ədəd quduzluq nümunəsi üzərində molekulyar bioloji testlərin aparılması və Azərbaycanda sirkulyasiya edən quduzluq virusunun ştammini müəyyənləşdirmək. Bundan başqa bu ştammin hansı ölkədən gəldiyini müəyyənləşdirmək və filogenetik analizləri aparmaq.

AHVLA-ya gəldiyim ilk gün Dr.Dan Horton məni laboratoriya ilə yaxından tanış etdi. Laboratoriyaya yeni gəlmiş insanlar üçün olan anketi doldurdum və imzaladım. Biotəhlükəsizlik üzrə menecer Derek, mənə riayət etməli olduğum qaydaları izah etdi: əlimi kəsərsənsə kimə müraciət etməliyəm, yanğın barədə signal eşidəndə hara getməliyəm, şəxsi qoruyucu geyim vasitələri və təhlükəli reagentlərlə iş qaydaları.

Bakıdan gətirdiyimiz nümunələrdən RNT-ni əldə etmək üçün:

1. Harris Micro-panç ilə nümunələrin ağ hissəsindən 2 mm götürülür.
2. 50 µl HPLC(bidistil su) əlavə edilmiş tyublara, götürülmüş nümunə atılır və buz üzərində saxlanılır.
3. Hər dəfə yeni nümunə götürəndə, panç 100%-li etanol ilə təmizlənir.
4. Nümunələr 1 saat buz üzərində saxlanılır və hər 15 dəqiqədən bir vortekslənir.
5. Əldə edilmiş RNT istifadəyə qədər -80C saxlanılır.

Bundan sonra spektrofotometrlə RNT-nin miqdarı ölçüdü.

I hissədə RT-PCR testini etmək üçün hazırlıq üçün master-miks hazırlanır:

Reagentlər	Bir reaksiya üçün miqdar (µl)	18 nümunə üçün miqdar (µl)
HPLC grade su	6	108
RT bufer (5x)	4	72
dNTPs	1	18

DTT	1	18
Random Hexamers	2	36
JW12	2	36
RNAsin	1	18
MMLV	1	18
Cəmi	18	324

Hazırlanmış mastermiksdən 18 µl tyublara paylanılır və üzərinə 2 µl RNT əlavə edilir. Pozitiv kontrolun üzərinə 2 µl pozitiv 50 və negativ kontola 2 µl su əlavə edilir. Ümumi həcm 20 µl.

Sonra nümunələr 42°C isidiciyə yerləşdirilir və 1 saat inkubasiya edilir.

II hissədə yeni Hemi nested testi üçün JW6/12 master miks hazırlanır:

Reagentlər	Bir reaksiya üçün miqdar (µl)	18 nümunə üçün miqdar (µl)
HPLC grade su	33.075	595.35
GAB bufer (10x)	4	72
dNTPs	1	18
JW6DPL	1	18
JW6M	1	18
JW6E	1	18
JW12	1	18
Amlitaq gold	0.25	4
Tmac	1	18
DMSO	0.675	12
Cəmi	45	324

Hazırlanmış mastermiksdən 45µl tyublara əlavə edilir və üzərinə isidicidən götürülmüş nümunələrin 5 µl tökülür. Əlavə olaraq 1ədəd PCR pozitiv və 1 ədəd PCR negativ qoyulur (5 µl pozitiv kontrol və 5 µl su). Sonra hər birində 50 µl olan nümunələr amplifikatora yerləşdirilir. Proqrama uyğun olaraq reaksiya işə salınır.

III hissədə gel hazırlanır:

Kolbaya 100 ml duruldulmuş TAE 50x buferi və üzərinə 1.9 qram aqaroza əlavə edilib, mikrodalğalı sobaya qoyulur-2 dəqiqə. Hazır olduqdan sonra bir az soyudulur (soyuq su ilə). Biotəhlükəsizlik şkaında qelin üzərinə 5 µl sybr green rəngi əlavə edilir və əvvəlcədən hazırlanmış tankerin qabına tökülür. Hər tankerin öz ölçüsünə uyğun qabı var. Gel soyuyandan sonra onun darağı və lentləri çıxardılır. Plaşkaya hər nümunə üçün (2 ədəd lader üçün əlavə olaraq) 3µl loading boya əlavə edilir və üzərinə amplifikatordan götürülmüş nümunələrdən 5µl əlavə edilir. Reagentləri qarışdırıb 8µl gelin içərisinə əlavə edilir. Kontrollardan əvvəl və

sonra gelə ladder-nərdivan əlavə edilir. Tanker müvafiq hissəsinə kimi TAE 50x buferi ilə doldurulur. Sonra tankerin qapağı örtülür və toka qoşulur – 120V, 1 saat.

1 saatdan sonra gel tankerdən çıxardılır və örtülü kameraya yerləşdirilir. Kompyuterdə aydınlaşdırılan qelin şəkli çəkilir.

7 may aparılan testin nəticəsində 3 nümunə müsbət nəticə verdi.

IV hissədə JW10/12 yeni master-miks hazırlanır:

Reagentlər	Bir reaksiya üçün miqdar (µl)	18 nümunə üçün miqdar (µl)
HPLC grade su	33.075	
GAB bufer (10x)	4	
dNTPs	1	
JW10DPL	1	
JW10M	1	
JW10E	1	
JW12	1	
Amlitaq gold	0.25	
Tmac	1	
DMSO	0.675	
Cəmi	49	

Hazırlanmış mastermiksdən 49µl tyublara əlavə edilir və üzərinə III hissədən götürülmüş nümunələrin 1 µl tökülür. Sonra hər birində 50 µl olan nümunələr amplifikatora yerləşdirilir. Proqrama uyğun olaraq reaksiya işə salınır.

IV hissənin geil hazırlanır:

Kolbaya 100 ml duruldulmuş TAE 50x buferi və üzərinə 1.9 qram aqaroza əlavə edilib, mikrodalğalı sobaya qoyulur-2 dəqiqə. Hazır olduqdan sonra bir az soyudulur (soyuq su ilə). Biotəhlükəsizlik şkafinda qelin üzərinə 5 µl sybr green rəngi əlavə edilir və əvvəlcədən hazırlanmış tankerin qabına tökülür. Hər tankerin öz ölçüsünə uyğun qabı var. Gel soyuyandan sonra onun darağı və lentləri çıxardılır. Plaşkaya hər nümunə üçün (2 ədəd lader üçün əlavə olaraq) 3µl loading boya əlavə edilir və üzərinə amplifikatordan götürülmüş nümunələrdən 5µl əlavə edilir. Reagentləri qarışdırıb 8µl gelin içərisinə əlavə edilir. Kontrollardan əvvəl və sonra gelə ladder-nərdivan əlavə edilir. Tanker müvafiq hissəsinə kimi TAE 50x buferi ilə doldurulur. Sonra tankerin qapağı örtülür və toka qoşulur – 120V, 1 saat.

TAE50x bufer: 1980ml distil su + 200ml TAE50x

1 saatdan sonra gel tankerdən çıxardılır və örtülü kameraya yerləşdirilir. Kompyuterdə aydınlaşdırılan qelin şəkli çəkilir.

Aparılan növbəti test RT-PCR Taqman idi. Bunun üçün master-miks hazırlanır:

Reagentlər	Bir reaksiya üçün miqdar (µl)
HPLC grade su	28.70
Mg bufer	5
MgCl ₂	12
dATP	0.1
dTTP	0.1
dGTP	0.1
dCTP	0.1
JW12	0.20
N165-146	0.20
problar	0.05
RabCT15	0.05
RabCT6	0.05
Tritonx100	0.10
RNAsin	0.25
RT enzim	0.50
Taq polimeraza	0.50
Cəmi	48

Hazırlanmış mastermiksın üzərinə 2µl RNT əlavə edilir. Qapaqları bağlanır və Real-zaman PCR maşınına yerləşdirilir. Spesifik proqrama uyğun olaraq reaksiyaya start verilir.

Nəticələr kompyuterin ekranında əks olunur.

Bakı-15 nümunələr sekvenatorada sekans edildi. Sekven edilmiş nümunələr xüsusi proqramla işləndi və filogenetik analizi aparıldı.

NƏTİCƏLƏR CƏDVƏLİ

N	Ekspertiz nömrəsi	Daxil olma tarixi	Rayon	Heyvanın növü	Hemi-nested PCR	TAGman RT-PCR	Sekvens məlumat	Nəticə
1	273	04.04.13	Qax	it	pozitive	pozitive		pozitive
2	486	10.09.12	Qax	Inək	pozitive	pozitive		pozitive
3	347	26.04.13	Zaqatala	It	pozitive	pozitive	Positive, Rusiya	pozitive
4	325	19.04.13	Kurdəmir	Inək	pozitive	pozitive	Positive, Rusiya	pozitive

5	552	05.10.12	Daşkəsən	Inək	pozitive	pozitive		pozitive
6	156	19.02.13	Laçın	It	pozitive	pozitive		pozitive
7	270	03.04.13	Şeki	It	pozitive	pozitive		pozitive
8	334	23.04.13	Qax	It	pozitive	pozitive		pozitive
9	742	14.12.12	Oğuz	Inək	pozitive	pozitive		pozitive
10	784	27.12.12	Tərtər	It	pozitive	pozitive	Positive, Rusiya	pozitive
11	587	16.10.12	Abşeron	at	pozitive	pozitive		pozitive
12	23	10.01.13	Şeki	it	pozitive	pozitive		pozitive
13	255	29.03.13	Balakən	Inək	pozitive	pozitive	pozitive	pozitive
14	141	16.01.13	Zaqatala	It	negative	pozitive		pozitive
15	36	13.02.13	Daşkəsən	Inək	pozitive	pozitive		pozitive