

Проблемы инфекционной патологии XXI века. Материалы юбилейной конференции, посвященной 80-летию НИИЭМ (г. Минск 27–28 октября 2004 г.) / Под ред. проф., чл.-корр. НАНБ Л.П. Титова. — Мн.: НИИЭМ, 2004. — С. 110–119.

3. Соринсон С.Н., Селиванов Н.А., Корочкина О.В. и др. Гепатит С: механизмы многолетней персистенции вируса и фазы течения инфекционного процесса // Клиническая медицина. — 1997. — № 10 — С. 27–30.

4. Львов Д.К. Вирусные гепатиты С и G (Hepacivirus, Flaviviridae): этиотропная терапия // Вопр. вирусол. — 1998. — № 2. — С. 54–58.

5. Маянский А.Н., Обрядина А.П., Уланова Т.И. и др. Диагностика гепатита С: информационные материалы. — Н. Новгород, 2003. — 47 с.

6. Система диагностики диффузных паренхиматозных поражений печени у различных групп населения с повышенным риском инфицирования вирусными гепатитами В, С, D, G: Методические рекомендации. / С.В. Жаворонок, А.Л. Калинин, А.А. Ключарева и др. — Мн., 1998. — 52 с.

7. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. — СПб.: ТЕЗА, 1998. — 325 с.

8. Bukh J. The hepatitis C virus. American Association for the Study of Liver Diseases Post-graduate Course 2000, Update on Viral Hepatitis, October 27–28. — Dallas, Texas, 2000. — P. 102–111.

9. Sherlock S. December 1996. Hepatitis C Virus: a Historical Perspective. Digestive Diseases and Science 3S-5S.

Поступила 28.03.2005

УДК 575.1

ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ СУММАРНОЙ ДНК ИЗ ПАТОГЕННЫХ И САПРОФИТНЫХ ГРИБОВ КЛАССОВ *ASCOMYCETES*, *BASIDIOMYCETES* И *DEUTEROMYCETES*

М.Я. Острикова, О.Ю. Баранов

Гомельский государственный медицинский университет
Институт леса

Предложен быстрый микрометод выделения препаратов суммарной ДНК из грибов родов *Candida*, *Aspergillus*, *Pleurotus* и *Lentinus*. Установлено, что полученные микропрепараты ДНК грибов характеризуются высокой степенью чистоты и отсутствием деградации.

Ключевые слова: ДНК, *Aspergillus*, *Candida*, *Pleurotus*, *Lentinus*

CHARACTERISTIC FEATURES OF ISOLATION OF TOTAL DNA FROM PATHOGENIC AND SAPROPHYTE *ASCOMYCETES*, *BASIDIOMYCETES* AND *DEUTEROMYCETES* FUNGUS

M.Ya. Ostriкова, O.Yu. Baranov

Gomel State Medical University
Institute of Forest

The micromethod of rapid preparation of DNA samples from fungi genus *Candida*, *Aspergillus*, *Pleurotus* и *Lentinus* have been developed. Showed, that prepared samples of DNA have high quality of clearness and no visual degradation.

Key words: DNA, *Aspergillus*, *Candida*, *Pleurotus*, *Lentinus*.

Введение

К настоящему времени методы анализа ДНК [2, 3, 4] нашли широкое практическое применение в различных областях медицины: изучение и определение врожденных заболеваний на различных стадиях онтогенеза; выявление и типировка инфекционных возбудителей *in vitro* и *in vivo*; исследование гено-

мов и классификация штаммов микроорганизмов [3, 5], используемых для получения лекарственных средств и др. Для большинства используемых технологий первоначальным этапом анализа является выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты из изучаемых объектов [1, 5]. Важным требованием, предъявляемым к стадии экстракции, является

ся получение препаратов ДНК, характеризующихся высокой степенью чистоты и отсутствием деградации [1, 5]. Данное условие может быть выполнено лишь при учете биохимических особенностей строения изучаемого объекта и подборе оптимальных условий, препятствующих разрушению и изменению структуры молекулы ДНК. Кроме того, используемая методика должна характеризоваться быстотой и экономичностью [1].

Целью данной работы явилась разработка методики выделения ДНК из мицелия грибов родов *Aspergillus*, *Candida*, *Pleurotus*, *Lentinus*.

Материалы и методы

В качестве исследуемых объектов использовали грибы родов *Aspergillus* и *Candida*, культивируемые на кафедре микробиологии, иммунологии, вирусологии Гомельского государственного медицинского университета; родов *Pleurotus* и *Lentinus*, предоставленных сектором микологии и культивирования съедобных грибов Института леса НАН Беларуси.

Выделение ДНК грибов производилось на основе технологии спиртового осаждения нуклеиновых кислот из их растворов [1, 5] с модификациями.

Гомогенизация и экстракция. Для этого навеску образца массой 4–7 мг помещали в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 0,5 мл, содержащую 100 мкл экстрагирующего буфера следующего состава: 200 мМ р-р солянокислого триса, рН 7,5, 250 мМ р-р хлорида натрия, 25 р-р мМ трилона Б, 0,5% лаурилсульфата натрия. Далее, используя прокаленные стеклянные пестики, производили гомогенизацию материала при комнатной температуре в течение 30–40 с. По окончании гомогенизации пробирку с растертыми образцами закрывали и встряхивали на вихревом смесителе (400–600 мин⁻¹) в течение 5 с. После этого пробирку помещали во встряхивающую ванну (200 мин⁻¹) и инкубировали в течение 15 мин при 65°C.

Очистка гомогенатов. После экстракции в пробирку добавляли 70 мкл охлажденного 5 М р-ра ацетата калия (рН 5,0). Содержимое перемешивали на вихревом смесителе (400 мин⁻¹) и инкубировали на ледяной бане в течение 10 мин. После инкубации гомогенаты смешивали с 100 мкл хлороформа. Далее производили центрифугирование при 15000×g (T = 4°C) в течение 20 мин.

Осаждение ДНК. По окончании центрифугирования пипеткой отбирали 150 мкл супернатанта и переносили в другую центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 0,5 мл и добавляли 130 мкл охлажденного изопропанола. После добавления спирта содержимое пробирки перемешивали на вихревом смесителе (600 мин⁻¹) и оставляли в роторе центрифуги на 5 мин. Далее производили центрифугирование при 15000×g (T = 0°C) в течение 10 мин.

Очистка препарата ДНК. Супернатант сливали, а полученный осадок ДНК промывали 250 мкл 65% этанола, охлажденного при –20°C. После промывания содержимое пробирок центрифугировали при 15000×g (T = 4°C) в течение 10 мин. Процедуру промывки проводили 2–3 раза для удаления из осадка остатков трилона Б, а также изопропанола.

Лиофилизация препарата ДНК. После промывки этанолом пробирки размещали в штативе и, открыв крышки, просушивали осадок ДНК в течение 30–40 мин (T = 45°C) до полного испарения этанола.

Растворение препарата ДНК. Высушенный осадок растворяли в 20 мкл деионизированной воды во встряхивающей ванне (200 мин⁻¹) при 65°C в течение 30 мин. Далее проводили спектрофотометрические измерения для определения концентрации и степени чистоты полученных препаратов ДНК.

Измерение при 260 нм позволяет рассчитать концентрацию нуклеиновой кислоты в пробе. Оптическая плотность $D = 1$ соответствует приблизительно 50 мкг/мл двухцепочечной ДНК. Соотношение экстинций 260нм / 280нм позволяет судить о чистоте нуклеиновой кислоты. Чистые препараты ДНК имеют соотношение не менее 1,65.

Электрофоретическое фракционирование проводили используя 0,7%-ный агарозный гель в 1,5×TBE буфере [5]. Затем окрашивали этидиум бромидом и фотодокументировали.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена спектрограмма препарата ДНК, выделенного из мицелия плесневых грибов. Спектрофотометрические измерения концентрации ДНК показали наличие только одного четко выраженного пика с максимумом около 260 нм и соотношением экстинций 260 нм/280 нм, равным 1,92, что свидетельствует о высокой степени чистоты препарата ДНК.

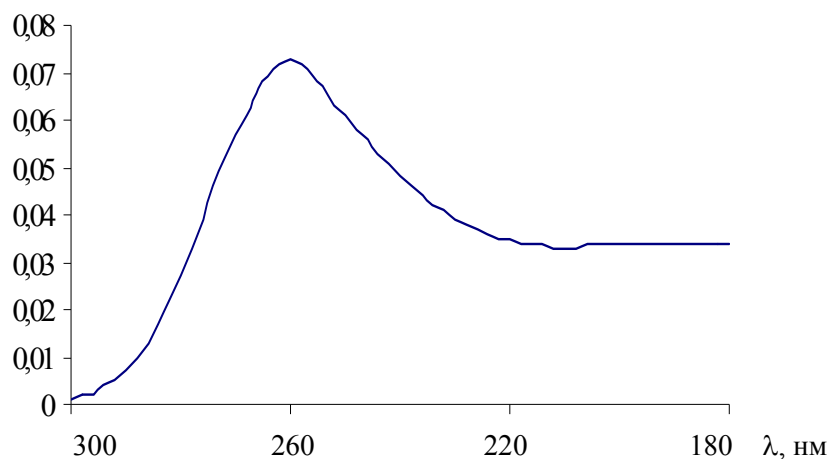


Рис. 1. Спектрограмма препарата ДНК из мицелия плесневых грибов

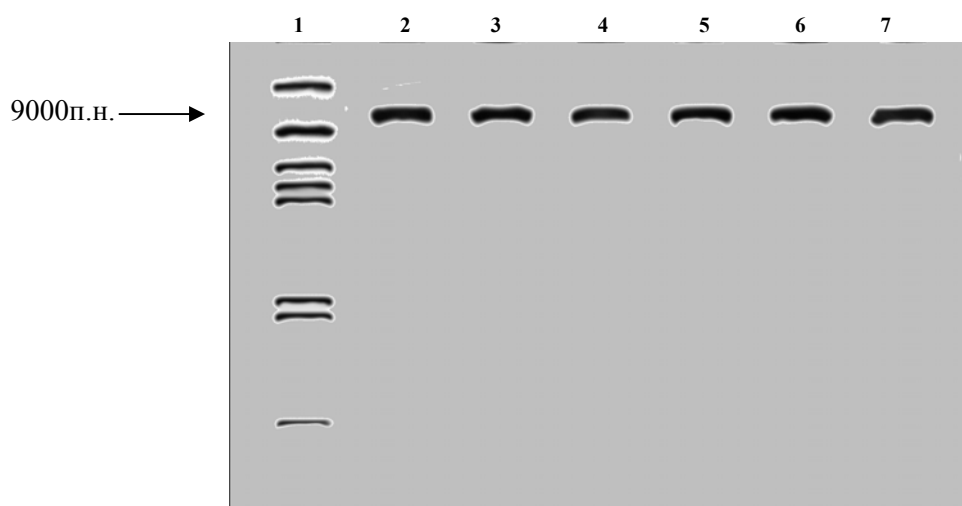


Рис. 2. Электрофореграмма препаратов ДНК, выделенных из различных грибов
1 — маркер молекулярной массы, 2, 3 — род *Aspergillus*, 4, 5 — род *Candida*,
6 — *Pleurotu ostreatus*, 7 — *Lentinus edodes*.

На рис. 2 представлены результаты электрофореза суммарной ДНК. Из результатов, представленных на электрофореграмме, видно, что препараты ДНК однородны по размеру и не деградированы. Следует также добавить, что при 4°C полученные образцы ДНК сохраняют свою целостность в течение нескольких месяцев, что является важным при проведении комплексных исследований.

Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований разработана методика выделения микропрепаратов суммарной ДНК из грибов родов *Candida*, *Aspergillus*, *Pleurotus* и *Lentinus*. Установлено, что полученные образцы ДНК характеризуются высокой степенью чистоты и отсутствием деградации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Использование ПЦР-анализа в генетико - селекционных исследованиях: Научно-методическое руководство / Под. ред. Ю.М. Сиволана. — Киев: Аграрна наука, 1998.
2. Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. // *Nucleic Acids Research*. — 1995. — Vol. 23. — P. 4407–4414
3. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — Vol. 18. — № 22. — P. 6531–6535.
4. Ford-Lloyd B., Painting K. Measuring genetic variation using molecular markers. — Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. — 72 p.
5. Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E.F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. — Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989. — 324 p.

Поступила 15.09.2003