

УДК 579.834.115:636.2

**Киркимбаева Ж.С., Ермагамбетова С.Е., Бияшев К.Б.,  
Жансеркенова О.О., Турсынакын Н.Б.**

*Казахский национальный аграрный университет*

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ЛЕПТОСПИР

### **Аннотация**

В статье приведены основные методические подходы при экстракции и очистке ДНК лептоспир из биологического материала для анализа методом полимераной цепной реакции. Результаты качественного и количественного анализа показали, что при выделении ДНК из клеток лептоспир лучшие результаты дают использование автоматической станции выделения НК –Thermo Scientific King Fisher, метод обработки бактериосодержащей суспензии детергентом – 10 % раствором додецилсульфата натрия в сочетании с протеиназой К, а также метод выделения ДНК из клеток лептоспир с помощью тритона X-100. Эти способы позволяют получить высокоочищенную хромосомную ДНК из клеток лептоспир в препаративном количестве, пригодном для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) и для клонирования.

**Ключевые слова:** Лептоспиры, лептоспироз, диагностика, ДНК, ПЦР, протеиназы.

### **Введение**

Полиморфизм клинических проявлений лептоспироза обуславливает необходимость улучшения клинической, лабораторной диагностики заболевания, методов выявления лептоспироза в продуктах убоя животных и ветеринарно-санитарной оценки. Наиболее перспективным является применение на практике молекулярно-генетических методов диагностики и прежде всего полимеразной цепной реакции, которая позволяет выявлять присутствие ДНК лептоспир в крови с начального периода заболевания до периода ранней реконвалесценции [1,2].

Количество исследований, посвященных изучению характера клинических проявлений лептоспироза в зависимости от серогруппы возбудителя, особенностей течения заболевания в периоде ранней и поздней реконвалесценции, очень ограничено. Нуждается также в уточнении диагностическая значимость РМА и ПЦР в различные периоды лептоспироза в зависимости от формы заболевания и серогруппы возбудителя.

По данным генетических исследований, выявлены особенности строения генома лептоспир, а именно: наличие двух кольцевых хромосом в клетке (размером 4500 и 350 тпн). Одну из хромосом раньше относили к плазмиде, однако после обнаружения на ней гена *asd*, отвечающего за синтез компонента пептидогликана (диаминопимелата), была впоследствии отнесена к "вторичной" хромосоме. Однако вопрос о наличии внехромосомных генетических элементов у лептоспир окончательно не решен. Была описана плаزمиды размером около 370 п.н.у вирулентных штаммов лептоспир, у свободноживущих непатогенных лептоспир плазмиды не обнаружены [3,4].

В целом, молекулярно-генетические тесты могут эффективно применяться при изучении этиопатогенеза лептоспирозной инфекции, для генотипирования лептоспир и в качестве метода лабораторной диагностики [5].

При диагностике лептоспироза животных методом ПЦР основным рабочим

материалом является ДНК бактерий [6]. Основным критерием в методах выделения ДНК является высокая степень очистки нуклеиновой кислоты от примесей клеточных ДНК и белков. Выделенная геномная ДНК должна быть нефрагментированной, так как она служит матрицей для синтеза специфического продукта. Результат ПЦР-диагностики зависит от оптимального способа выделения ДНК микроорганизмов [7].

В этой связи в задачу наших исследований было включено проведение исследования по отработке оптимальных методов экстрагирования бактериальной ДНК. Исследования проведены в рамках выполнения проекта «Идентификация возбудителей лептоспироза на основании геномной характеристики штаммов, выделенных от животных на территории Республики Казахстан» по бюджетной программе: 217 «Развитие науки», подпрограмма 102 Грантовое финансирование научных исследований

#### **Материалы и методы**

Процедура выделения ДНК из клеток и тканей часто является исходным (основным) этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне. От ДНК напрямую или через белки-ферменты зависят все биосинтезы и катаболизм клетки. Клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а хромосомную ДНК очистить от других клеточных компонентов. Прежде всего, нужно отделить ДНК от белков, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов хроматина. При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и максимально сохранить её целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются [5].

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы:

- 1) лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом);
- 2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа;
- 3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл. Затем ДНК осаждают из раствора этанолом и после центрифугирования растворяют осадок в буферном растворе. Вместе с ДНК частично выделяется и РНК, от которой избавляются с помощью фермента РНКазы.

В работе использовали музейные штаммы лептоспир, из «исторической» коллекции лаборатории противобактериозной биотехнологии: *L.pomona*, *L.icterohaemorrhagiae*, *L.tarassovi*, *L.canicola*, *L.hebdomadis*, *L.australlis*, *L.grippotyphosa*. Лептоспиры культивировали в водно-сывороточной среде, при температуре 28°C.

Для выбора оптимального варианта в работе использовали несколько методов выделения ДНК:

- Выделение ДНК с помощью лизостафина.
- Выделение ДНК с помощью сорбентов;
- Способ выделения ДНК основанный на использовании буферных растворов, содержащих высокие концентрации солей-хаотропов типа гуанидинтиоцианата.
- Выделение ДНК из культуры лептоспир с помощью автоматической станции выделения нуклеиновых кислот – Thermo Scientific King Fisher.
- Выделение ДНК из бактериальной культуры лептоспир проводили обработкой протеолитическим ферментом – протеиназой К.
- Выделение ДНК из клеток лептоспир с помощью тритона X-100, разработанную сотрудниками лаборатории противобактериозной биотехнологии КазНАУ.

#### **Результаты исследования**

Главными критериями при отработке оптимальных методов были концентрация и чистота препарата.

После выделения ДНК из клеток лептоспир вышеперечисленными методами проводили качественный и количественный анализ образца. Электрофорез проводили в 0,8 % агарозном геле в ТАЕ-буфере. Спектрофотометрически измеряли отношение между оптическими плотностями при 260 и 280 нм. Максимум поглощения для нуклеиновых кислот регистрируется при длине волны 260 нм. Препарат ДНК считается свободным от примесей при величине отношений  $E_{260/280}$  равным 1,8 и выше. Если этот показатель ниже указанного, то образец загрязнен белками или фенолом.

Образцы ДНК из клеток лептоспир, полученные с использованием детергентов лизостафина и сорбента, оказались невысокого качества. Отношения между оптической плотностью при длинах волн 260 и 280 нм в среднем составляли 1,65-1,7, что говорило о загрязненности ДНК белком и другими примесями.

Лучшие результаты были получены при обработке бактериосодержащей суспензии детергентом – 10 % раствором додецилсульфата натрия в сочетании с протеиназой К и с последующей экстракцией фенол/хлороформом. Применение додецилсульфата натрия не только депротеинизирует бактериальную клетку, но также подавляет активность нуклеаз. Клеточные белки удаляли обработкой протеолитическим ферментом – протеиназой К. Для удаления белков и разрыва связей ДНК-белок использовали смесь фенол-хлороформ, который является более сильным средством депротеинизации. Отношение оптической плотности ( $E_{260}/E_{280}$ ) полученных препаратов ДНК лептоспир имело среднее значение  $1,820 \pm 0,02$ .

Хорошие результаты дают использование автоматической станции выделения ДНК – Thermo Scientific King Fisher. Отношение оптической плотности ( $E_{260}/E_{280}$ ) полученных препаратов ДНК лептоспир имело среднее значение  $1,75 \pm 0,05$ .

Лучшие результаты были получены при использовании метода выделения ДНК из клеток лептоспир с помощью тритона X-100. Отношение оптической плотности ( $E_{260}/E_{280}$ ) полученных препаратов ДНК *Leptospira interrogans* имело среднее значение  $1,91 \pm 0,03$  ( $n=4$ ) (рисунок 1).

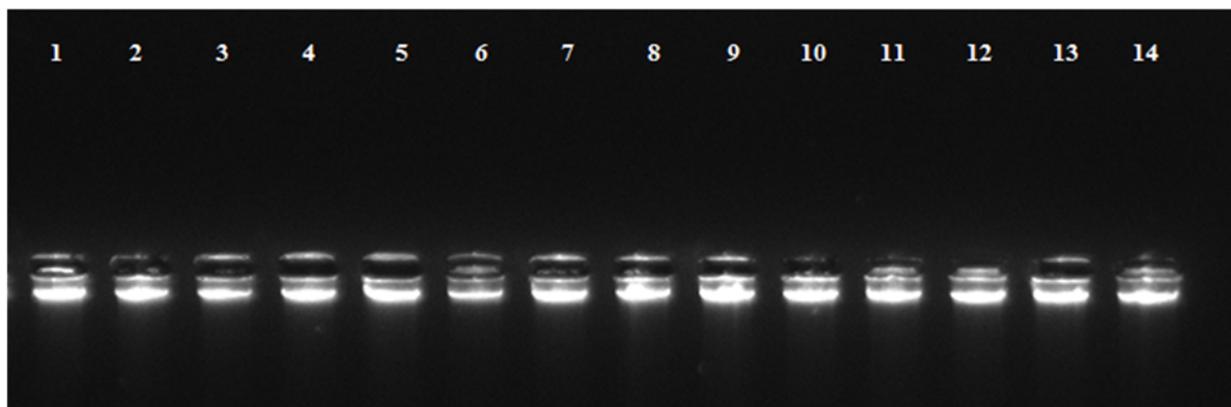


Рисунок 1 – Электрофореграмма ДНК лептоспир. С 1 по 7 - ДНК лептоспир выделенные набором: Thermo Scientific King Fisher; с 8- по 14 - ДНК из клеток лептоспир выделенные с помощью тритона X-100

Дорожки представляют собой образцы ДНК, выделенные из разных штаммов лептоспир. Дорожки с 1 по 7 - ДНК лептоспир выделенные набором: Thermo Scientific King Fisher, с 8- по 14 - ДНК из клеток лептоспир выделенные с помощью тритона X-100,

разработанные сотрудниками лаборатории противобактериозной биотехнологии КазНАУ. Как видно из электрофореграммы, испытанные методы выделения ДНК позволили получить в достаточном количестве, что отражается в виде четких линий.

### **Заклучение**

Результаты качественного и количественного анализа показали, что при выделении ДНК из клеток лептоспир хорошие результаты дают использование автоматической станции выделения НК –Thermo Scientific King Fisher, метод обработки бактериосодержащей суспензии детергентом – 10 % раствором додецилсульфата натрия в сочетании с протеиназой K, а также метод выделение ДНК из клеток лептоспир с помощью тритона X-100. Способы позволяют получить высокоочищенную хромосомную ДНК из клеток лептоспир в препаративном количестве, пригодном для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) и для клонирования.

### **Литература**

1. *Киркимбаева Ж.С., Ермагамбетова С.Е., Мурзабаев К.Е.* Вопросы диагностики лептоспироза животных/ Мат.междунар. конф. «Состояние и перспективы диагностики инфекционных болезней животных», Агроуниверситет: Астана, 2008, - С. 272-281.
2. *Белюсов В.И.* Лептоспироз животных в Российской Федерации и меры борьбы с ним / Лептоспироз: матер.10-й Всерос. науч. -практ. конф. по лептоспирозу. - Краснодар, 2003.-С.6-10.
3. *Киселева Е.Ю., Бренева Н.В., Носков А.К., Шаракшианов М.Б., Балахонов С.В., Гефан Н.Г.* Методы лабораторной диагностики лептоспирозов: особенности постановки, преимущества и недостатки//Бюллетень ВСНЦ СО, 2015, '3 (103),- С.85-93.
4. *Пантюхова Т.Н.* Роль ПЦР-диагностики в проблеме верификации диагноза лептоспироза.: Автореф. дисс.... кандидата мед. наук.- Москва, 2006.- 166 с.:
5. *Викторова Е.В.* Полимеразная цепная реакция при диагностике лептоспироза и изучение органотропности лептоспир у сельскохозяйственных животных//дисс.на соискание канд.вет.наук.-2006.112с.
6. *Назар Б.И.* Оценка методов выделения ДНК из биологического материала// вестник науки Гос. научно-иссл. контрольного института вет. препаратов и корм.добавок.- Том 16, №1 (61), часть 2, 2015, С. 133-137.
7. *Crisrine Branger, Beatrice Blanchard, Catherine Fillonneau, Isabelle Suard, Florence Aviat, Bruno Chivallier, Genevieve Andre-Fontaine.* Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene *hab 1* encoding the hemolysis-associated protein-1//FEMS Microbiology Letters 243 (2005). 437-445.

**Киркимбаева Ж.С., Ермагамбетова С.Е., Бияшев К.Б.,  
Жансеркенова О.О., Турсунакын Н.Б.**

**ЛЕПТОСПИРАЛАР ДНҚ БӨЛІП АЛУ ҮШІН ӘР ТҮРЛІ ТИІМДІ ТӘСІЛДЕР АРҚЫЛЫ  
САЛЫСТЫРМАЛЫ ТҮРДЕ ЗЕРТТЕУ**

### **Аңдатпа**

Бұл мақалада полимеразды тізбекті реакция анализдері үшін биологиялық материалдан лептоспиралардың ДНҚ-сын бөліп алу мен экстракция кезіндегі негізгі әдістемелік нұсқаулықтар көрсетілген. Сандық және сапалық талдаудың нәтижесінде, лептоспира

торшаларынан ДНҚ бөліп алуға НК –Thermo Scientific King Fisher автоматты станциясында жақсы нәтиже көрсетті. Құрамында бактерия бар детергентті суспензияны өңдеу әдісі - 10% натрий додецисульфаты мен К протеиназаны пайдаландық. Сонымен қатар, лептоспира торшаларынан ДНҚ бөліп алу үшін тритон X-100 әдісі қолданылды. Бұл әдістер полимеразды тізбек реакциясы мен клондау үшін лептоспира торшаларынан жоғары тазалықтағы хромосомды ДНҚ алуға болады.

**Кілт сөздер:** Лептоспиралар, лептоспироз, балау, ДНҚ, полимеразды тізбек реакциясы, протеиназалар.

**Kirkimbayeva Zh.S., Ermagambetova S.E., Biyashev K.B.,  
Zhanserkenova O.O., Tursunakyn N.B.**

#### COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF VARIOUS METHODS FOR THE ISOLATION OF DNA OF LEPTOSPIRA

##### *Annotation*

The article presents the basic methodological approaches in the extraction and purification of DNA of *Leptospira* from a biological material for analysis by polymerase chain reaction. The results of qualitative and quantitative analysis showed that the allocation of the DNA of *Leptospira* cells give the best results use automatic station selection NC –Thermo Scientific King Fisher. Bacterio processing method comprising detergent slurry - 10% sodium dodecyl sulfate in combination with proteinase K. And a method of DNA extraction from *Leptospira* cells with Triton X-100. These methods allow to obtain highly purified chromosomal DNA of *Leptospira* cells in Preparative amount suitable for formulation of the polymerase chain reaction (PCR) and cloning.

**Keywords:** *Leptospira*, Leptospirosis, diagnosis, DNA PCR, proteinase.

**ӘОЖ: 619:616:084**

**Күлмесханқызы Т., Заманбеков Н.А.,  
Туруспаева Ш.Д., Оспанкулов А.**

*Қазақ ұлттық аграрлық университеті*

#### ТІКЕНЕКТІ ШОМЫРТ (PRUNUS SPINOSA) ДӘРІЛІК ӨСІМДІГІНЕН ДАЙЫНДАЛҒАН ТҮНБАНЫҢ БҰЗАУЛАР ҚАНЫНЫҢ МОРФОЛОГИЯЛЫҚ КӨРСЕТКІШТЕРІНІҢ ДИНАМИКАСЫНА ӘСЕРІ

##### **Аңдатпа**

Бұл жұмыста тікенекті шомырт өсімдігінен дайындалған түнбаның бұзаулар қанының морфологиялық көрсеткіштеріне әсер етуінің нәтижелері көрсетілген. Алынған зерттеу нәтижелері дайындалған түнбаның диспепсия ауруына шалдыққан бұзаулар қанының морфологиялық көрсеткіштеріне қуаттандырып әсер ететіндігін көрсетті. Тәжірибе тобындағы бұзаулар қанының морфологиялық көрсеткіштерінің шекті жоғарылау деңгейі зерттеу мерзімінің 14-ші және 21-ші тәуліктерінде тіркелді. Тәжірибе тобында лейкоциттердің, лимфоциттердің, моноциттердің, эритроциттердің және гемоглобиннің сандық