

И. А. ГОНЧАРОВА, А. А. АРАШКОВА, О. В. ЕВДОКИМОВА,
Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ, А. М. ТРИГУБОВИЧ, А. А. КОСТЕНЕВИЧ

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS* ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
sorbic@mbio.bas-net.by

Проведена сравнительная оценка эффективности извлечения нуклеиновых кислот из биомассы представителей рода *Aspergillus*, выделенных из очагов плесневого поражения. Апробированы методы разрушения биомассы с помощью механической дезинтеграции и химического лизиса. Полнота выделения ДНК из мицелиальных пленок, полученных при поверхностном культивировании на целлофановых дисках, была выше, чем из глубинного мицелия. Использование в качестве лизирующего буфера комбинированного состава из анионного и катионного детергентов (1% ЦТАБ и 2% ДСН) позволило обеспечить необходимую чистоту и достаточное количество ДНК для молекулярно-генетической идентификации микромицетов.

Введение. В настоящее время все большее внимание уделяется болезням, вызываемым плесневыми грибами. Грибы, развивающиеся в толще и на поверхности строительных материалов, не являясь по своей природе болезнетворными, могут вызывать микозы различной локализации или провоцировать аллергические реакции. В число наиболее опасных для здоровья видов входят представители рода *Aspergillus* [1].

Род *Aspergillus* включает более 300 видов. Около 20 видов относятся к возбудителям оппортунистических инфекций у людей. Аспергиллез включает довольно широкий круг микогенных заболеваний, которые в первую очередь влияют на легкие, так как попадание грибных спор в организм человека происходит преимущественно ингаляционным путем [2]. Наиболее часто выделяемым видом в клинической практике является *A. fumigatus*. К другим распространенным видам, обладающим оппортунистическими свойствами, относятся *A. flavus*, *A. niger*,

A. terreus, а к менее распространенным – *A. nidulans*, *A. versicolor*, *A. candidus*, *A. oryzae*, *A. sydowii*, *A. clavatus* [3].

Возможность отличать представителей рода *Aspergillus* друг от друга с использованием морфологических методов часто осложнена высоким полиморфизмом внутри каждого из видов или высокими межвидовыми сходствами. Учитывая важность процедуры видовой идентификации аспергиллов, клиницисты и исследователи все чаще прибегают к использованию современных методов, основанных на применении технологий молекулярной генетики [4, 5].

Наиболее точным методом «молекулярной» идентификации является определение полной нуклеотидной последовательности амплифицированной ДНК и сравнение ее с соответствующими последовательностями известных видов [6].

Цель исследования – подбор и оптимизация метода выделения ДНК из мицелия плесневых грибов рода *Aspergillus* для последующего молекулярно-генетического анализа.

Материалы и методы. Объектами исследования служили грибы рода *Aspergillus*, выделенные из очагов плесневого поражения. Идентификация на основании микро- и макроскопических признаков позволила отнести выделенные культуры к видам *A. calidoustus*, *A. flavus* и *A. niger*.

Микромицеты растили на среде Чапека–Докса. Глубинное культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера на лотковой качалке до образования мелких пеллет. При поверхностном культивировании грибные споры высевали газоном на поверхности целлофановых дисков, помещенных на агаризованную среду в чашках Петри, и инкубировали до получения тонких мицелиальных пленок без генеративных органов.

Сравнение эффективности выделения ДНК проводили с использованием коммерческого набора «Нуклеосорб А» («Праймтех», Беларусь) и различных составов лизирующего буфера (2% Тритон Х-100, 2% ДСН (додецилсульфат натрия), 1% ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид), 1% ЦТАБ + 2% ДСН в сочетании с инкубированием при температуре 65 °С в течение 2 ч.

Депротеинизацию полученного лизата проводили смесью хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1) или ацетатом натрия (3 М).

Нуклеиновые кислоты осаждали изопропанолом, отмывали в 70%-ном спирте, осадок растворяли в ТЕ буфере. Для удаления РНК в каждую пробирку добавляли 0,5 мкл РНКазы А (10 мг/мл) и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С.

Электрофоретический анализ ДНК проводили в геле, содержащем 0,8% агарозы и ТАЕ-буфер (1x) с бромистым этидием (50 мкг/л). Для визуализации и сохранения результатов электрофореза применяли систему цифровой видеодокументации ChemiDoc («BioRad», США).

Количество ДНК в препаратах определяли спектрофотометрически с помощью нанофотометра P330 («Implen», Германия). Концентрацию ДНК пересчитывали на сухой вес биомассы.

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали следующий состав реакционной смеси: 2,5x ПЦР-буфер со смесью дезоксинуклеотидтрифосфатов – 8 мкл, 4 mM раствор каждого праймера – 2 мкл, ДНК-матрица (50 нг/мкл) – 1 мкл, *Pfu*-полимеразы (5 ед/мкл) – 1 мкл, вода – до 20 мкл.

Для получения последовательностей целевых фрагментов ДНК ITS1–LR3 и ITS1–LR5 использовали следующие праймеры: ITS1 (tccgtaggtgaacctgctgg), LR3 (ccgtgtttcaagacggg), LR5 (tcctgagggaaacttcg). ПЦР проводили по следующей программе:

1-й этап (1 цикл). Преденатурация: t = 1 мин, T = 98 °С.

2-й этап (35 циклов). Денатурация: t = 10 с, T = 98 °С. Отжиг: t = 20 с, T = 47 °С. Элонгация: t = 1 мин 10 с, T = 72 °С.

3-й этап (1 цикл). Элонгация: t = 4 мин, T = 72 °С.

4-й этап (1 цикл). Охлаждение реакционной смеси: t = 4 мин, T = 4 °С.

Лигирование продуктов ПЦР в коммерческий вектор pJET1.2/blunt проводили в реакционной смеси, содержащей буфер для лигирования, 5% полиэтиленгликоль 4000, 2,5 ед. Вейса ДНК-лигазы T4 при 22 °С в течение 30 мин.

Трансформацию бактерий *E. coli* XL1-Blue, предварительно переведенных в состояние компетентности, проводили согласно методическим рекомендациям, изложенным в руководстве к электропоратору «MicroPulser» («BioRad», США).

Плазмидную ДНК из бактерий выделяли методом щелочного лизиса с использованием набора для выделения плазмидной ДНК GeneJET Plasmid Miniprep Kit («ThermoScientificBio», ЕС) согласно инструкции производителя.

Рестрикцию плазмидной ДНК осуществляли рестриктазами BglII и PstI («ThermoScientificBio», ЕС) согласно рекомендациям фирмы производителя.

Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве маркерной ДНК использовали GeneRuler DNA Ladder Mix («ThermoScientificBio», ЕС).

Секвенирование осуществляли с помощью набора DNA Cycle Sequencing Kit («Jena Bioscience», Германия) и меченных флуоресцентной меткой Cy5.5 праймеров pJET-F (cgactcactatagggagagcggc) и pJET-R (aagaacatcgattttccatggcag) («Праймтех», Беларусь). Продукты секвенирующей реакции детектировали с помощью автоматического секвенатора 4300 DNA Analyzer («Li-COR Biosciences», США). Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы eSeq V.3.1 («Li-COR Biosciences», США). Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с доступными последовательностями из базы данных ГенБанк проводили с помощью программы BLASTN 2.3.1 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты и обсуждение. Разрушение биомассы микроорганизмов при выделении нуклеиновых кислот часто является серьезной проблемой из-за наличия в клеточной стенке грибов прочной хитин-гликокановой структуры, обуславливающей защиту от механического, физического и химического воздействия. Особую сложность в этом плане представляют микроскопические грибы – агенты биоповреждений, которые, как правило, характеризуются повышенной устойчивостью к воздействию факторов внешней среды [7].

При механической гомогенизации пеллет глубинного мицелия путем замораживания-кипячения, обработки ультразвуком, измельчения с кварцевым песком, растирания в жидком азоте с последующей экстракцией с помощью коммерческого набора

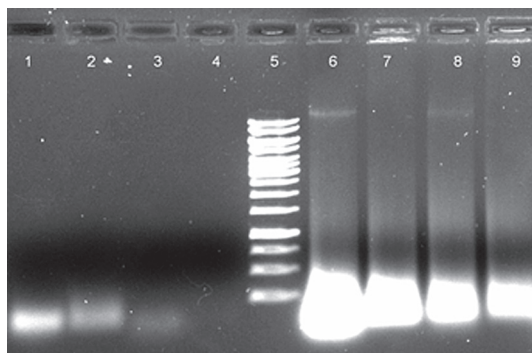


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов ДНК, выделенных из глубинного мицелия (пеллет) *A. flavus* 55, с использованием различных лизирующих буферов: 1, 2 – при лизисе в буфере с 0,5% ДСН; 3, 4 – при лизисе в растворе для разрушения клеток набора «Нуклеосорб А»; 6–9 – при лизисе в буфере с 1% ЦТАБ; 5 – маркер молекулярного веса ДНК 1kb DNA Ladder

«Нуклеосорб А» ДНК на электрофореграммах практически отсутствовала (данные не представлены).

Если после разрушения пеллет механическими методами для выделения ДНК использовали ЦТАБ, то в экстракте преобладали низкомолекулярные фрагменты нуклеиновых кислот, а крупные фрагменты геномной ДНК не детектировались (рис. 1).

Поскольку строение и свойства структурных биополимеров клеточной стенки микромицетов могут зависеть от условий культивирования [8], то в качестве биологического материала использовали не только глубинный мицелий, но и поверхностный, полученный при культивировании в чашках Петри на целлофановых дисках. Результаты микрофотографирования показали, что клеточные стенки поверхностных гиф до начала спороношения значительно тоньше, чем у пеллет, что устранило необходимость в предварительной дезинтеграции мицелия.

При подборе условий для химического лизиса мицелиальных пленок – модификации состава и концентраций используемых детергентов, времени лизиса и применения прогревания – достаточно высокую эффективность при минимизации фрагментации

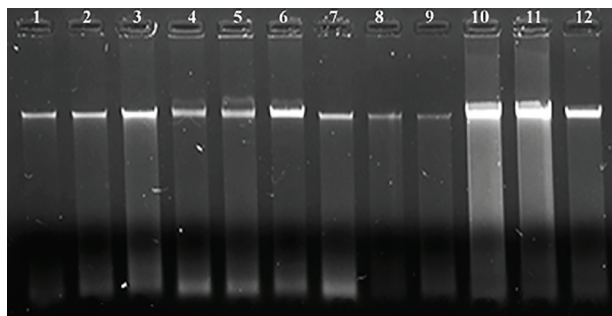


Рис. 2. Электрофореграмма ДНК, выделенной из мицелиальных пленок *A. flavus* 55, с использованием различных составов лизирующего буфера: 1–3 – при лизисе в буфере с 1% ЦТАБ; 4–6 – при лизисе в буфере с 2% ДСН; 7–9 – при лизисе в буфере с 1% Тритон Х-100; 10–12 – при лизисе в буфере с 1% ЦТАБ, 2% ДСН

ДНК показало инкубирование при температуре 65 °С в течение 2 ч с использованием в качестве лизирующих буферов однокомпонентных составов на основе 2% Тритон Х-100, 2% ДСН, 1% ЦТАБ, а также комбинированного состава двух детергентов – 1% ЦТАБ и 2% ДСН (рис. 2).

Оценка выделенного из мицелиальных пленок *A. flavus* 55 количества ДНК с помощью спектрофотометрии позволила сравнить эффективность лизирующих составов. При использовании буфера с 2% Тритон Х-100, 2% ДСН или 1% ЦТАБ содержание выделенной ДНК колебалось в пределах 0,2–0,4 мкг/мг сухой биомассы. При последовательном действии детергентов ДСН и ЦТАБ в сочетании с прогреванием выход ДНК увеличился более чем в 5 раз (табл. 1).

Применение буфера с 1% ЦТАБ и 2% ДСН позволило получить препараты ДНК высокой концентрации из мицелиальных пленок разных видов *A. calidoustus*, *A. flavus*, *A. niger* (рис. 3).

Полученные препараты ДНК были использованы для постановки ПЦР-анализа универсального для грибов идентификационного локуса рДНК, включающего области межгенных транскрибируемых спейсеров ITS1, ITS2 и вариабельные домены D1–D3 гена 28S рРНК (рис. 4).

Таблица 1. Эффективность выделения ДНК из мицелиальных пленок *A. flavus* 55 с использованием различных составов лизирующего буфера

Лизирующий буфер	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	ДНК, нг/мкл	Выход ДНК, мкг/мг сухой биомассы
Тритон	1,521	27,0	0,16
	1,561	51,5	0,17
	1,769	46,0	0,15
ДСН	1,645	76,5	0,30
	1,702	97,0	0,24
	1,618	89,0	0,34
ЦТАБ	1,727	47,5	0,43
	1,694	41,5	0,20
	1,737	49,5	0,27
ЦТАБ + ДСН	1,836	262	1,00
	1,789	130	1,10
	1,750	102	0,96

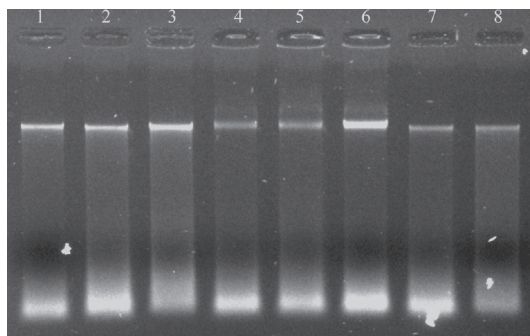


Рис. 3. Электрофореграмма ДНК, выделенной из мицелиальных пленок разных видов рода *Aspergillus*, при лизисе в буфере с 1% ЦТАБ и 2% ДСН: 1–2 – *A. calidoustus* 65; 3–4 – *A. flavus* 7; 5–6 – *A. flavus* 55; 7–8 – *A. niger* 19



Рис. 4. Генетическая карта региона амплификации (визуализация получена с помощью программы SnapGene Viewer)

В результате ПЦР с матриц грибной ДНК с парой праймеров ITS1 и LR3 были получены продукты амплификации размером около 1200 п. н., в реакции с парой праймеров ITS1 и LR5 – около 1500 п. н. После дополнительной очистки продукты амплификации лигировали с коммерческим вектором pJET1.2/blunt. Полученными конструкциями трансформировали клетки *E. coli* XL1-Blue.

Рестрикционный анализ плазмид, соответствующих по размеру вектору с искомой вставкой (рис. 5), проводили рестриктазами BglII и PstI. Поскольку в плазмиде pJET1.2 оба сайта рестрикции BglII находятся по краям вставки, то после ее обработки этой рестриктазой появляется два фрагмента, соответ-

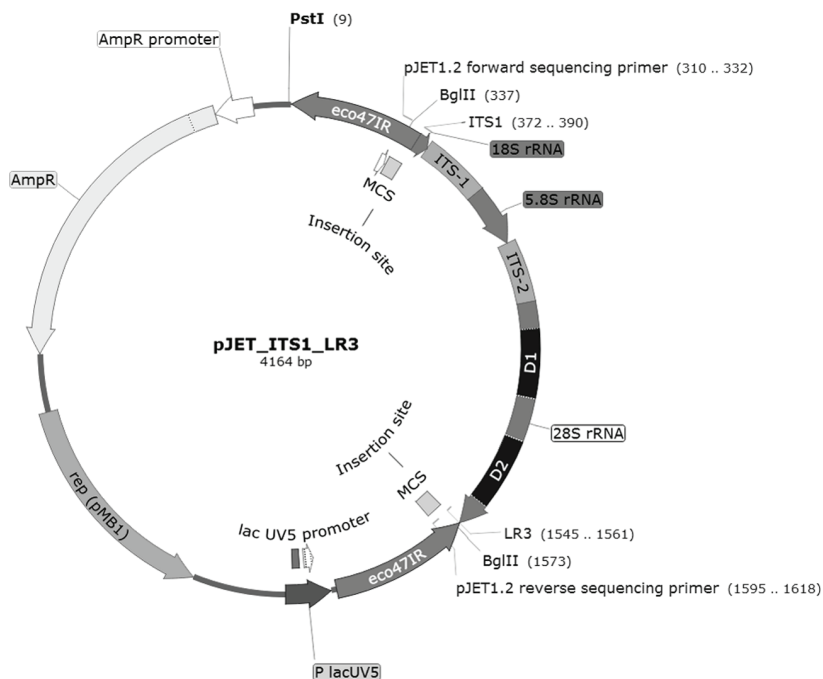


Рис. 5. Генетическая карта плазмиды pJET1.2_ITS1-LR3, содержащей идентификационный локус ITS1-LR3 хромосомной ДНК микромицетов (визуализация получена с помощью программы SnapGene Viewer)

ствующих размеру вектора и размеру вставки. Рестриктаза PstI режет в одном месте, в результате образуется линейная форма плазмиды. Плазмиды, содержащие искомую вставку, использовали в секвенирующей реакции для установления их нуклеотидных последовательностей.

Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с базой данных ГенБанк подтвердило, что все исследованные изоляты являются представителями рода *Aspergillus*. Однако последовательность, полученная при применении пар праймеров ITS1 и LR3, недостаточно информативна для четкого разделения некоторых близкородственных видов рода *Aspergillus*, например, *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. parasiticus*. Анализ более длинной последовательности кластера рибосомных генов ITS1–LR5 также не дал желаемых результатов, так как поиск гомологий был затруднен отсутствием достаточного количества референсных последовательностей, депонированных в ГенБанке (табл. 2).

Таблица 2. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей идентификационных локусов хромосомной ДНК разных видов рода *Aspergillus*

Изолят	Процент сходства с последовательностями из базы данных ГенБанк	
	от ITS1 до LR3	от ITS1 до LR5
<i>Aspergillus calidoustus</i> 65	<i>Aspergillus</i> sp. BM5 (KJ567460.1) – 100% <i>Aspergillus calidoustus</i> , strain Kw18-1 (HG931696.1) – 100% <i>Aspergillus pseudodeflectus</i> strain AS3 (JN982703.1) – 100%	<i>Aspergillus</i> sp. 3 VH-2015 (LN873932.1) – 95%
<i>Aspergillus flavus</i> 2	<i>Aspergillus oryzae</i> isolate PT4 (KR871216.1) – 100% <i>Aspergillus flavus</i> strain YOPX-FS01 (KR296914.1) – 100% <i>Aspergillus parvisclerotigenus</i> strain AFc35 (KC964101.1) – 100%	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 (AP007172.1) – 99% <i>Aspergillus niger</i> strain NJA-1 (KJ365316.1) – 94%

Изолят	Процент сходства с последовательностями из базы данных Генбанка	
	от ITS1 до LR3	от ITS1 до LR5
<i>Aspergillus flavus</i> 55	<i>Aspergillus oryzae</i> isolate PT4 (KR871216.1) – 100% <i>Aspergillus flavus</i> strain YOPX-FS01 (KR296914.1) – 100%	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 16883 (NR_111041.1) – 99% <i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 502 (NR_121219.1) – 99%
<i>Aspergillus niger</i> 19	–	<i>Aspergillus niger</i> contig An11c0220 (AM270239.1) – 99%

Таким образом, оптимизированный метод выделения ДНК микромицетов рода *Aspergillus*, включающий последовательное действие анионных и катионных детергентов на мицелиальные пленки поверхностной культуры грибов, обеспечивает быстрое получение препаратов ДНК, пригодных для молекулярно-генетической идентификации. Поскольку уровень потенциальной опасности для здоровья человека представителей рода *Aspergillus* во многом зависит от их видовой принадлежности, существует необходимость проведения дальнейших исследований в данной области и пополнения базы данных ГенБанк.

Литература

1. *Gugnani, H. C.* Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli / H. C. Gugnani // *Frontiers in Bioscience*. – 2003. – N 8. – P. 346–357.
2. Оппортунистические инфекции у больных, получающих терапию антицитокиновыми препаратами / Е. Н. Беляева [и др.] // *Проблемы медицинской микологии*. – 2012. – Т. 14, № 3. – С. 12–22.
3. *Марфенина, О. Е.* Потенциально патогенные мицелиальные грибы в среде обитания человека. Современные тенденции / О. Е. Марфенина, Г. М. Фомичева // *Микология сегодня*. – М.: Национальная академия микологии. – 2007. – Т. 1. – С. 235–266.
4. *Badiee, P.* Invasive fungal infection in renal transplant recipients demonstrated by panfungal polymerase chain reaction / P. Badiee, P. Kordbacheh, A. Albori // *Experim. Clin. Transplant*. – 2007. – N 5. – P. 624–629.
5. Identification to the species level and differentiation between strains of *Aspergillus* clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR / M. Healy [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – N 42. – P. 4016–4024.
6. *Липницкий, А. В.* Молекулярно-генетические методы в диагностике и эпидемиологии инвазивных микозов / А. В. Липницкий, А. В. Топорков,

Д. В. Викторов // Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная академия микологии, 2016. – Т. 16. – С. 37–41.

7. Данилевич, В. Н. Новый подход для выделения геномной ДНК из дрожжей и грибов: получение ДНК-содержащих клеточных оболочек и их прямое использование в ПЦР / В. Н. Данилевич, Е. В. Гришин // Биоорганическая химия. – 2002. – Т. 28. № 2. – С. 156–167.

8. Феофилова, Е. П. Клеточная стенка грибов: современные представления о составе и биологической функции / Е. П. Феофилова // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 6. – С. 723–733.

*I. A. GONCHAROVA, A. A. ARASHKOVA, O. V. YEUDAKIMAVA,
L. N. VALENTOVICH, A. M. TRIGUBOVICH, A. A. KOSTENEVICH*

OPTIMIZATION OF DNA EXTRACTION FROM FUNGI OF THE GENUS *ASPERGILLUS* FOR MOLECULAR-GENETIC IDENTIFICATION

*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus,
sorbic@mbio.bas-net.by*

Optimization of DNA extraction conditions from mycelium of mould fungi belonged to the genus *Aspergillus* was hold. For biomass destruction methods of mechanical disintegration and chemical lysis on submerged biomass and surface mycelium films were used. Application of anionic and cationic detergents (1% CTAB и 2% SDS) provided DNA extraction sufficient for molecular-genetic identification.

Поступила 25.04.2016 г.

УДК 579.66+577.15

*И. С. КАЗЛОВСКИЙ, А. Н. РЫМКО, С. В. КВАЧ,
А. И. ЗИНЧЕНКО*

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* – ПРОДУЦЕНТА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ БАКТЕРИОФАГА T7

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
zinch@mbio.bas-net.by, microbio@mbio.bas-net.by*

С помощью методов геномной инженерии создан штамм-продуцент рекомбинантной РНК-полимеразы бактериофага T7, содержащий на С-конце октагистидиновый олигопептид. При создании штамма использовалась новая методика клонирования, основанная на применении продолжительно перекрывающейся ПЦР. Показано, что полученный генно-инженерный штамм способен продуцировать T7-РНК-полимеразу в количестве 105 мг/л культуральной жидкости.