

**МЕТОДИКА ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОТИПА *Trichinella spiralis*
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

И.М. ОДОЕВСКАЯ

кандидат биологических наук

И.И. БЕНЕДИКТОВ

доктор биологических наук

В.В. АСЕЕВ

кандидат биологических наук

Н.В. ХИЛЮТА

аспирант

Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии

им. К.И. Скрябина, 117218, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28,

e-mail: director@vniigis.ru

Л.А. БУКИНА

кандидат биологических наук

Вятская Государственная сельскохозяйственная академия.

610117, г. Киров, Октябрьский пр-т, 133, e-mail: l.bukina5@gmail.com

(Одобрена секцией «Инвазионные болезни животных» отделения ветеринарной медицины РАСХН 23 сентября 2011 г., протокол № 3)

Разработана методика межвидовой и внутривидовой дифференциации гельминтов, идентификации генотипа *Trichinella spiralis* методом полимеразной цепной реакции. Методика выявляет характерные для генома *T. spiralis* локусы ДНК и дает возможность устанавливать связь между природным и синантропным трихинеллезом в различных биоценозах. Метод основан на взаимодействии синтезированных олигонуклеотидных праймеров со специфичными для данного генотипа паразита локусами ДНК. Происходит рост амплифицируемого фрагмента, характерного для данного генотипа. Электрофорез продуктов амплификации позволяет визуализировать фрагменты ДНК и определить их молекулярную массу. Приведен перечень оборудования и реактивов, дано описание процесса подготовки клинического материала, выделения геномной ДНК, подготовки реакционной смеси для полимеразной цепной реакции и режим проведения амплификации и электрофореза.

Ключевые слова: *Trichinella spiralis*, метод полимеразной цепной реакции, дифференциация, ДНК.

Назначение и область применения

Методика предназначена для использования в научных целях при изучении таксономии и систематики рода *Trichinella*, в частности межвидовой идентификации и внутривидовой дифференциации гельминтов, а также для решения ряда вопросов популяционной эпизоотологии и эпидемиологии трихинеллеза.

В настоящее время большинство зарубежных исследователей считают, что род *Trichinella* включает 8 видов-двойников: *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murelli*, *T. nelsoni*, *T. papuae* и *T. zimbabwensis*, а также три генотипа – Т6, Т8 и Т9.

Приведенная методика позволяет четко выявлять характерные для генома *T. spiralis* локусы ДНК, что дает возможность устанавливать эпизоотоло-

гические и эпидемические взаимосвязи между природным и синантропным трихинеллезом в различных биоценозах.

Суть метода

Современным, надежным молекулярно-биологическим методом, позволяющим оперативно оценить таксономические отношения гельминтов, является полимеразная цепная реакция (ПЦР), основанная на взаимодействии синтезированных олигонуклеотидных праймеров со специфичными для данного генотипа паразита локусами ДНК. В ходе реакции происходит экспоненциальный рост амплифицируемого фрагмента, характерного для данного генотипа. Последующий электрофорез продуктов амплификации позволяет визуализировать полученные фрагменты ДНК и определить молекулярную массу последних.

Оборудование и реактивы

Ламинарный шкаф или стерильный бокс; термоциклер «MyCycler 16450» фирмы «Bio-Rad», источник питания Power Park Basis 10-300v, 75в, центрифуга (не менее 12 тыс./об./мин.); термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 56 °С; набор автоматических пипеток переменного объема (1-20 мкл, 10-200 мкл, 200 мкл – 1 мл); одноразовые пластиковые наконечники для пипеток вышеуказанных объемов; полипропиленовые пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл, штативы для пробирок и наконечников; двухкамерный холодильник (с морозильной камерой, поддерживающей температуру – 20 °С); набор приборов для проведения электрофореза фирмы «Bio-Rad» (источник постоянного тока, ультрафиолетовый трансиллюминатор, камера для горизонтального электрофореза марки Mini Sub Cell GT); видеосистема с цифровым фотоаппаратом для документирования результатов; электрическая плитка или микроволновая печь для плавления агарозы; микроскоп или бинокулярная лупа; компрессориумы для трихинеллоскопии; набор инструментов для препарирования мышечной ткани; термостойкие стеклянные колбы; резиновые перчатки, респираторы.

Для выделения и очистки тотальной ДНК использовали набор реагентов фирмы «Invitrogen» Catalog № K1820-00, согласно рекомендациям производителя.

Для проведения ПЦР использовали готовый набор реактивов «Мастер Микс» фирмы «Изоген» и специфические олигонуклеотидные праймеры следующей структуры: F-GTTCCATGTGAACAGCAGT; R-CGAAAACATACGACAACCTGC.

Для проведения электрофореза использовали стандартный набор компонентов: буфер TAE - 1x (маточный раствор 50x), бромистый этидий – 20 мкл на 100 мкл 2 % агарозы, предварительно расплавленной в 100 мл буфера TAE – 1x.

Подготовка клинического материала

Для исследования использовали тонко нарезанные кусочки мышечной ткани общей массой не более 25 мг, при этом могут быть использованы пробы мышц как от живых (биопсия), так и от павших животных. Тонкие срезы мышечной ткани помещали в компрессорий и предварительно просматривали под бинокуляром при увеличении в 16-32 раза. Маркером по стеклу отмечали срезы, в которых имеются личинки трихинелл и использовали для выделения ДНК только эти образцы.

Выделение геномной ДНК

Осуществляли с использованием набора реактивов для получения и многоступенчатой очистки ДНК из клеток млекопитающих PureLink Genomic DNA Mini Kit фирмы «Invitrogen» (№ K1820-00).

Подготовка реакционной смеси для ПЦР и режим проведения амплификации

В пробирки «Эппендорф» объемом 0,2 мл из набора реактивов фирмы «Изоген», содержащие Taq-полимеразу 50 ед/мл – 0,5 мкл, d АТФ – 400 мкМ, d ЦТФ – 400 мкМ, d ГТФ – 400 мкМ, d ТТФ – 400 мкМ, MgCl₂ – 3 мМ, вносили по 5 мкл раствора исследуемой ДНК, по 2,5 мкл каждого праймера и 10 мкл двукратного буфера для ПЦР (из набора Мастер Микс). В качестве положительного и отрицательного контроля реакции использовано ДНК эталонных штаммов трихинелл. Пробирки сразу же помещали в термоциклер и запускали следующую программу амплификации:

«Горячий старт», предварительная денатурация при температуре 96 °С – 5 мин,

второй цикл - денатурация при температуре 95 °С – 30 с; отжиг праймеров при температуре 56 °С – 2 мин; элонгация цепей при температуре 72 °С – 1 мин.

Число циклов – 40.

Заключительная элонгация при температуре 72 °С – 5 мин.

Проведение электрофореза

2 г агарозы, растворенной в 100 мл буфера ТАЕ (1х), доводили до кипения и затем остужали до 45-50 °С. Бромистый этидий (1 %) добавляли непосредственно в гель в соотношении 1 : 100000 или проводили окрашивание самого геля вышеуказанным реактивом после окончания электрофореза в течение 10-15 мин в защищенном от света месте. Предметный столик устанавливали и с помощью уровня строго горизонтально, зажимами закрепляли подложку для геля. Расплавленную агарозу заливали в форму камеры (толщина геля не более 5 мм), вставляли гребенку. Период полимеризации геля при комнатной температуре – 30-40 мин, объем вносимых в лунки геля образцов – 5-20 мкл. Маркер молекулярной массы (так называемый «леддер» - набор фрагментов ДНК молекулярной массой от 50 до 500 н.п.) является ориентиром для окончания электрофореза. В УФ-свете (длина волны 260 нм) должны просматриваться все полосы маркера М-50 или М-100. Электрофорезную камеру, соблюдая полярность, подключали к источнику питания; ток устанавливали из расчета 10 в/см геля. Соответственно амплифицированный фрагмент ДНК, принадлежащий *T. spiralis*, имел молекулярную массу 173 н.п. и визуализировался между уровнями электрофоретической подвижности фрагментов маркера 150-200 н.п.

Примечание. Для получения объективных результатов идентификации принадлежности исследуемых трихинелл к генотипу *T. spiralis* рекомендовано выделять ДНК не менее чем из 5 личинок и использовать ДНК эталонных штаммов.

Identification of genotype *Trichinella spiralis* using polymerase chain reaction

I.M. Odoyevskaya

PhD in biological sciences

I.I. Benediktov

doctor of biological sciences

V.V. Aseev

PhD in biological sciences

N.V. Hilyuta

postgraduate

*All-Russian Scientific Research Institute of Helminthology
named after K.I. Skryabin, 117218, Moscow, B. Cheremushkinskaya., 28,
e-mail: odoevskayaim@rambler.ru*

L.A. Bukina

PhD in biological sciences

Vyatka State Agricultural Academy, 610117, Kirov, Oktyabrsky pr., 133,
e-mail: l.bukina5@gmail.com

(Approved by section «Invasive diseases in animals», Division of Veterinary Medicine of RAAS on 23rd of September 2011, Protocol No 3)

Methods for interspecific and intraspecific differentiation of helminthes, identification of genotype *Trichinella spiralis* using polymerase chain reaction are developed. These methods detect DNA loci specific for genome *T. spiralis* and enables to determine connection between natural and synanthropic trichinellosis in different biocenosis. Methods are based on interaction of synthesized oligonucleotide primers with DNA loci typical for this parasite genotype. The amplified fragment length is increasing. Electrophoresis of amplification products enables to visualize the DNA fragments and find their molecular mass. The list of equipment and reagents is presented, the process of preparation of clinical trial materials, release of genomic DNA, preparation of reaction mixture for polymerase chain reaction, amplification and electrophoresis modes are described.

Keywords: *Trichinella spiralis*, method of polymerase chain reaction, differentiation, DNA.