

О РАЗРАБОТКЕ МЕТОДА ПЦР ДИАГНОСТИКИ ТРИХИНЕЛЛЕЗА

Черноус Е.А., Бутвиловский В.Э.

Белорусский государственный медицинский университет

Введение. В настоящее время для верификации диагноза трихинеллеза используется метод иммуноферментного анализа (ИФА), однако диагностически значимый титр антител в сыворотке появляется только к 14-15 дню инвазии и достигает максимума к 4-12 неделе. Совершенствование методов молекулярно-генетического анализа и накопление данных о нуклеотидных последовательностях паразитических нематод позволило разработать и успешно применять метод ПЦР – диагностики трихинеллеза. Согласно данным ряда исследователей [1] ПЦР – анализ детектирует мигрирующих личинок в крови хозяина с 5-го по 14-й день инвазии, что оптимально для своевременного назначения лечения, имеющего наибольший эффект в первые две недели после заражения.

Учитывая перспективность применения метода ПЦР-диагностики трихинеллеза в Республике Беларусь, большой интерес представляет разработка и апробация методик молекулярно-генетического исследования трихинелл.

Цель: определить лучшую методику экстракции тотальной ДНК, подобрать условия и праймеры для оптимизация ПЦР митохондриальных генов *Trichinella spiralis*.

Материалы и методы. Объектом исследования служил лабораторный штамм *Trichinella spiralis* (который более 40 лет поддерживается на кафедре биологии БГМУ на крысах линии Wistar) выделенный из крысы (самец) согласно методике (Экспериментальный трихинеллез: методы воспроизведения модели» О.-Я.Л. Бекиш, И.И. Бурак, Н.Н. Острейко, Витебск 1982 г.).

Выделение и очистка тотальной ДНК проводилась с использованием следующих подходов: 1) набором «Genomic DNA purification kit» (Fermentas #K0512) (добавочно проводилась инкубация с протеиназой К); 2) по модификации стандартного метода выделения ДНК из биологических объектов с использованием протеиназы К и последующей переочисткой фенолом, фенол-хлороформом и переосаждением спиртами (фенольный метод)[2].

Качество и относительное количество выделенной ДНК оценивалось электрофорезом в 0,8% агарозном геле (окрашивание этидием бромидом) и последующей визуализации на трансиллюминаторе.

С помощью программы Primer 3 нами были разработаны праймеры к генам митохондрий *Trichinella spiralis* (таблица.1).

Таблица 1. Праймеры для амплификации генов митохондрий *Trichinella spiralis*

Ген	Последовательность праймера (5'-3')	Направление	Размер ампликона, п.н.	Tm	Позиция в геноме*
Nad4L	cccaaccaacacctcac	F	411	53°	3850-3868
Nad4L	gtggtgtgcgggtaattg	R		53°	4260-4241
Nad 3	tcaccaacaagacgtaccaatc	F	380	53°	9838-9859
Nad 3	agttaccaagagctcactcaag	R		53°	10217-10195
Nad 6	ccgcaatccataaattctacag	F	420	53°	4544-4565
Nad 6	tgtttcttgctcctgggatt	R		53°	4963-4944
Cox2	taaccgaacacacctgcatc	F	748	53°	12123-12142
Cox2	tctgccatactgattgggtg	R		53°	12870-12851

Примечание. *Нумерация согласно первому нуклеотиду в последовательности (ГенБанк PubMed №AF293969)

ПЦР проводили на приборе «GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems)». Амплификация ставилась в 15 мкл. реакционной смеси, содержащей: 100-200 нг ДНК, 0,36 μ M прямого и обратного праймера, 1,5 мкл. 10x буфера (Dialat, Россия), 1,6 mM MgCl₂, 0,250 mM dNTP и 1 U Taq-полимеразы. Условия амплификации: преденатурация - 4 мин при 94⁰C ; 30 циклов - 1 мин при 94⁰C, 1 мин при 53⁰C, 1 мин при 72⁰C и заключительный этап элонгации при 72⁰C в течение 5 минут. Продукты амплификации анализировали после электрофоретического разделения в 2% агарозном геле (окрашивание этидием бромидом).

Результаты и обсуждение. Используя два принципиально различных подхода выделения ДНК из трихинелл установлено, что наибольшее количество ДНК получается при использовании модифицированного метода выделения тотальной ДНК из биологических объектов с протеиназой К и последующей переочисткой фенолом.

С помощью разработанных нами праймеров к участкам генома митохондрий трихинеллы была проведена ПЦР *Nad4L*, *Nad 3*, *Nad 6* и *Cox2* генов. На электрофореграмме (рис. 1), представлен результат специфической ПЦР по генам митохондрий трихинелл.

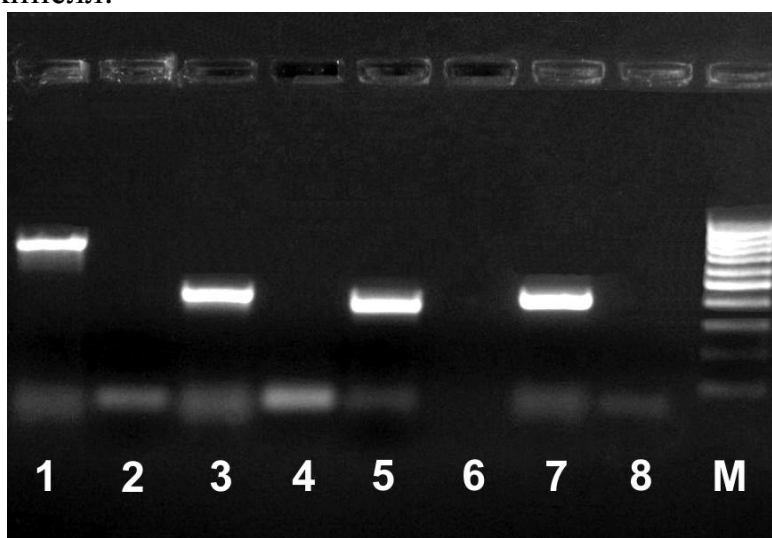


Рис.1. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР в 2% агарозном геле. Дорожки: 1,3,5,7 – фрагменты соответствующие генам *Cox2*, *Nad6*, *Nad3* и *Nad4L*

соответственно, 2,4,6,8 – отрицательный контроль для каждого из генов, М - 100bp маркер молекулярной массы

Как видно из рисунка 2 в результате амплификации нарабатывается продукт соответствующего размера (см. таблицу 1), неспецифика практически отсутствует, что свидетельствует о том, что праймеры и условия амплификации подобраны оптимально.

Выводы.1) В результате исследования определена лучшая методика выделения ДНК из нематод. 2) Сконструированы праймеры и оптимизированы условия амплификации четырех генов мтДНК трихинеллы.

Литература.

1. Pichart Uparanukraw, Nimit Morakote. Detection of circulating *Trichinella spiralis* larvae by polymerase chain reaction.//Parasitology research. – 1997. – Vol. 83. – P.52-56

2. Секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих ряд ферментов дыхательной цепи круглых червей: Отчет о НИР (заключ.)/Грант БРФФИ №Б08М-084 Руководитель работы Е.А. Черноус. - Мн.: 2010. 59 с.