

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДІВ РУЙНУВАННЯ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ІНТАКТНИХ ФОРМ ПЛАЗМІДНОЇ ТА ХРОМОСОМНОЇ ДНК

Тимченко О.М., Похил С.І.

Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України,
м. Харків

Молекулярно-генетичні дослідження є потужним сучасним знаряддям для вирішення різних актуальних наукових задач (проблем) в біології і медицині, в тому числі, в медичній мікробіології. Для проведення різноманітних генетичних досліджень мікроорганізмів виникає необхідність руйнування мікробної клітини і виділення препаратів нуклеїнових кислот - ДНК і РНК з достатньо високим рівнем чистоти та максимально можливим рівнем збереження цілісності цих полімерних макромолекул. Якщо технології виділення із клітинного детриту і очищення зразків ДНК та РНК відносно добре уніфіковані та практично відпрацьовані, то етап руйнування клітин бактерій ще й до теперішнього часу залишається, на думку багатьох науковців, технічно складним [1, 2, 3, 4]. Ці технічні труднощі обумовлені особливостями побудови і складу стінки клітин у надзвичайно різноманітному царстві мікроорганізмів, що не дозволило на теперішньому етапі розробити універсальні ефективні методи руйнування клітин прокариот для “тонкого” дослідження їх геному. В залежності від природи руйнівного чинника методи руйнування клітин мікроорганізмів (РКМ) розділяють на фізичні та хімічні [2, 4, 5]. Серед фізичних найчастіше застосовують ультразвук (ефект кавітації газів), різку зміну тиску, механічну гомогенізацію та струшування із скляними кульками, тощо. Хімічні методи РКМ умовно розділяють на дві підгрупи: методи з використанням в технологічному процесі дії лише одного детергенту; методи, що поєднують дію детергенту і гідролітичного ферменту [6, 7]. Фізичні методи вважаються більш ефективними для руйнування стінок мікробних клітин різного типу, але вони надто “грубі” щодо забезпечення необхідної цілісності великих полімерних молекул, і зумовлюють надмірну, безсистемну фрагментацію нуклеїнових кислот, особливо хромосомної ДНК (ХрДНК). Тому, для більш тонких досліджень геному при отриманні його інтактних нефрагментованих форм перевага віддається хімічним методам РКМ.

Метою цієї роботи було експериментальне визначення найбільш перспективних методів РКМ для виділення препаратів ХрДНК і плазмідної ДНК (ПлДНК), придатних для молекулярно-генетичних досліджень.

Матеріали і методи

Для руйнування клітин мікроорганізмів з метою виділення препаратів ПлДНК і ХрДНК апробовано 1 фізичний і 6 хімічних методів: ультразвуковий метод (УЗМ), гуанідін тіоціонатний метод (ГТМ), К-протеїназний метод (КПМ), метод швидкого міні-лізису (МШМЛ), метод лужного лізису (МЛЛ), метод тритонового лізису (МТЛ), метод лізису в агарозних блоках (МЛАБ). Випробовування цих технологій здійснено на мікроорганізмах різних таксономічних груп, які мають суттєві відмінності в побудові клітинної стінки: 3-х штаммах *S. aureus* subsp. *aureus* (грампозитивні коки) і 3-х штаммах *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* (грамнегативні палички), які представляють групу 17 і групу 5 у відповідності із 9-м виданням “Bergey's Manual of Determinative Bacteriology” (1994) [8, 9].

Клітини бактерій із 5,0 мл бульйонної культури в логарифмічній фазі росту двічі відмивали в рівному об'ємі стерильної дистильованої води (СДВ). Осад суспендували в 1,0 мл СДВ, готуючи вихідну висококонцентровану суспензію клітин бактерій (ВСКБ). З останньої в подальшому шляхом розведення готували робочі суспензії клітин бактерій (РСКБ), в яких і здійснювали РКМ. РСКБ містили 10^6 КУО/мл, що відповідає 0,021 одиницям оптичної

щільності (о.о.щ.) для стафілококів та 0,023 о.о.щ. для сальмонел при колориметричному визначенні з $\lambda=590$ нм на фотоколориметрі РФК-2МП.

РКМ з допомогою **УЗМ** здійснювали диспергатором ультразвуковим УЗДН-2Т у відповідності із інструкцією по експлуатації підприємства-виробника [5]. Для відмивання і суспендування бактерійних клітин застосовували СДВ. РКМ проводили в об'ємі 10 мл РСКБ в трубчатій насадці диспергатора при робочих частотах генератора і випромінювачів 22 і 44 кГц, номінальній вихідній електричній потужності 400 Вт. Тривалість режимів ультразвукового дезинтегрування складала: 30 сек., 60 сек., 120 сек., 240 сек. (2×120 сек.), 360 сек. (3×120 сек.), 480 сек. (4×120 сек.). В подальшому УЗДН передбачає застосування стандартних процедур очищення, осадження, розчинення і зберігання ДНК [10, 11, 12].

РКМ за допомогою **МЛЛ** здійснювали за модифікованим методом Н. Birnboim і J. Doly [4]. Для цього ВСКБ по краплі вносили в 0,5 мл літичного розчину I (ЛР I) – (25мМ трис-НСІ з рН=8,0, 50 мМ глюкоза, 20 мМ ЕДТА, 2 мг/мл лізоцим А) до досягнення РСКБ, ретельно перемішували і додавали 1,0 мл ЛР II (0,2 Н NaOH, 1% (вага/об'єм) додецилсульфат натрію). Суспензію перемішували та інкубували при $t=18-22$ °С 10 хв. В подальшому МЛЛ передбачає проведення процедури депротейнізації шляхом осадження білоквміщуючих комплексів оцтовокислим натрієм та концентрування ДНК при її осадженні етанолом.

РКМ з допомогою **ГТМ** здійснювали в модифікації А.М. Hossain і співав. [13]. Для цього по краплі ВСКБ вносили в 5 мл буферу для лізису клітин (6 М гуанідин, 30 мМ натрій цитрат з рН=7,0, 0,5% (об'єм/об'єм) лаурілсаркозин натрія, 0,2 мг/мл протеїназа К, 0,3 М β -меркаптоетанол) до досягнення РСКБ, інкубували при $t=55$ °С впродовж 3-4 годин. В подальшому ГТМ передбачає застосування стандартних процедур осадження ДНК, проведення депротейнізації та розчинення і зберігання ДНК [14, 13].

РКМ з допомогою **КМП** здійснювали модифікованим методом за N. Blin і D.W. Stafforg [15]. Для цього 5 мл РСКБ обробляли 25 мкл розчином протеїнази К (20 мг/мл ферменту в СДВ) та 125 мкл лаурілсаркозина натрія (10% вага/об'єм), перемішували та інкубували при $t=50$ °С впродовж 5-6 годин. В подальшому КМП передбачає застосування стандартних процедур депротейнізації фенолом, сумішшю хлороформу та ізоамілового спирту, осадження ДНК етанолом, розчинення ДНК в ТЕ буфері.

МШМЛ здійснювали за методом Klein R.D. і співав. [1, 16].

МТЛ проводили точно за керівництвом [2].

МЛАБ проводили за технологією авторів Т. Маніатіса та ін. [16]. Відтворення останніх трьох методів РКМ для гампозитивних коків *S. aureus* здійснено в авторській модифікації, яка полягала в заміні лізоциму на лізостафін ("Sigma Ch. Co", 3,000U/мл) в літичних сумішах на відповідних етапах РКМ [17].

Критеріями ефективності застосування методу РКМ були: % клітин бактерій в РСКБ, які вдавалось зруйнувати при використанні даного методу (% зруйнованих клітин бактерій, % ЗКБ); концентрація звільненої ДНК у рідкій фазі суміші після РКМ (КЗ ДНК); рівень цілісності (РЦ) мономерів плазмідної і хромосомної ДНК (РЦ ПлДНК і РЦ ХрДНК).

Критерій % ЗКБ визначали при проведенні фазово-контрастної мікроскопії з масляною імерсією. Обраховували % ЗКБ за формулою: $P = 100 - \frac{m}{n} \cdot 100\%$, де m - абсолютне число інтактних (незруйнованих) клітин бактерій в 10-и полях зору препаратів РСКБ, оброблених одним із методів РКМ, n - абсолютне число інтактних клітин бактерій в 10-и полях зору необроблених препаратів РСКБ.

КЗ ДНК визначали за допомогою шкали контрольних плям поступових (кратних) розведень ДНК сперми лосося ("Sigma Chemical Co.", США) з концентрацією від 0,1 мкг/мл до 20 мкг/мл. Порівнювали флюоресценцію контрольних і досліджуваних зразків на трансліюмінаторі "Флускоп-2" (РФ) в ультрафіолетових (УФ) променях з довжиною хвилі 305 нм.

Критерій РЦ ПлДНК і РЦ ХрДНК визначали шляхом проведення електрофорезу в горизонтальному агарозному гелі зразків РСКБ, оброблених різними методами РКМ [2, 10].

Електрофорез проводили в горизонтальній камері з використанням приладу ПЭФ-3 при напрузі електрополя 6-8 Вольт/см впродовж 4-х годин. Візуалізацію результатів електрофорезу здійснювали при просвічуванні пластинки гелю в УФ-променях з використанням транслюмінатора як викладено вище. Оцінювали в хрестах монотипність і чіткість електрофореграм (ЕФ) (“+++” – монотипні, чіткі смуги на електрофоретичних треках; “++” – на треках поряд з чіткими, розрізняються окремі смуги з розмитими, нечіткими краями, спостерігається відхилення від монотипності ЕФ, утворюваних ПлДНК і ХрДНК; “+” – на треках розмиті суцільні стрічки, смуги не розрізняються [17].

Результати та їх обговорення

Застосування УЗМ при РКМ показало відносно низьку ефективність цього методу. Із 12-ти апробованих режимів ультразвукового (газовокавітаційного) дезінтегрування лише найбільш “жорсткі” забезпечили руйнування не більше ніж 25% клітин в суспензіях стафілококів (табл. 1). Ці ж самі умови дозволили зруйнувати більше 50% клітин сальмонел (табл. 2). Подальше удосконалення УЗМ виявилось безперспективним, бо навіть відносно “м’які” режими призводили до значної дезінтеграції звільненої ХрДНК та ПлДНК, що унеможлилювало їх подальший аналіз.

Методи руйнування клітин – ГТМ, КПМ, які знайшли широке використання при клінічних молекулярно-біологічних дослідженнях зразків біотичного матеріалу від людей і тварин [3, 11, 18] виявились мало ефективними для РКМ. З допомогою цих методів вдавалось зруйнувати в суспензіях менше 8% клітин стафілококів і не більше 37% клітин сальмонел (табл. 1 і 2).

Таблиця 1. Результати руйнування клітин бактерій виду *S. aureus* subsp. *aureus* і при застосуванні технологій ГТМ, КПМ, УЗМ, МШМЛ, МЛЛ, МЛАБ і МТЛ

Метод РКМ	Показники $(\bar{x} \pm \bar{d})$ ефективності РКМ			
	ЗКБ (%)	КЗ ДНК (мкг/мл)	РЦ ПлДНК	РЦ ХрДНК
ГТМ	3,0±0,2	<0,1	-	-
КПМ	7,5±0,5	<0,1	-	-
УЗМ, режим дезінтегрування				
22 кГц, 30 сек	<0,1	<0,1	-	-
22 кГц, 60 сек	<0,1	<0,1	-	-
22 кГц, 120 сек	0,8±0,2	<0,1	-	-
22 кГц, 240 сек	1,6±0,3	<0,1	-	-
22 кГц, 360 сек	1,8±0,4	<0,1	-	-
22 кГц, 480 сек	2,0±0,4	<0,1	-	-
44 кГц, 30 сек	1,6±0,5	<0,1	-	-
44 кГц, 60 сек	2,6±0,6	<0,1	-	-
44 кГц, 120 сек	10,0±3,5	~0,1	+	+
44 кГц, 240 сек	14,0±3,8	~0,15	+	+
44 кГц, 360 сек	10,2±4,0	~0,2	+	+
44 кГц, 480 сек	24,0±4,2	~0,25	+	+
МШМЛ	35,0±6,0 >99,9*	~0,2 ~0,75	++	+
МЛЛ	14,8±2,8* >99,9*	~0,15 ~0,75	+++	+
МЛАБ	6,2±0,3 >99,9*	~0,1 ~1,5	-	+++
МТЛ	12,6±3,6 >99,9*	~0,1 ~1,0	+++	+

Примітка: “*” – значення показника, яке визначено при використанні в технологічному процесі РКМ лізостафіну замість лізоциму; “-” – за даних умов експерименту визначити значення показника ефективності методу РКМ не вдалось.

Таблиця 2. Результати руйнування клітин бактерій виду *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* при застосуванні технологій ГТМ, КПМ, УЗМ, МШМЛ, МЛЛ, МЛАБ і МТЛ

Метод РКМ	Показники ($\bar{x} \pm \bar{d}$) ефективності РКМ			
	ЗКБ (%)	КЗ ДНК (мкг/мл)	РЦ ПлДНК	РЦ ХрДНК
ГТМ	24,0±5,2	~0,15	+++	+
КПМ	36,5±5,5	~0,2	+++	+
УЗМ, режим дезінтегрування				
22 кГц, 30 сек	5,8±1,9	<0,1	-	-
22 кГц, 60 сек	7,2±2,0	~0,1	-	-
22 кГц, 120 сек	21,8±3,2	~0,2	+	+
22 кГц, 240 сек	26,8±3,1	~0,2	+	+
22 кГц, 360 сек	34,4±5,0	~0,25	+	+
22 кГц, 480 сек	59,0±7,2	~0,5	+	+
44 кГц, 30 сек	8,7±4,0	~0,1	+	+
44 кГц, 60 сек	12,4±4,2	~0,15	+	+
44 кГц, 120 сек	49,1±7,0	~0,5	+	+
44 кГц, 240 сек	65,1±5,4	~0,5	+	+
44 кГц, 360 сек	78,3±7,7	~0,75	+	+
44 кГц, 480 сек	87,2±9,0	~0,75	+	+
МШМЛ	88,0±6,4	~1,0	+++	+
МЛЛ	90,7±8,5	~1,0	+++	+
МЛАБ	>99,9	~2,0	-	+++
МТЛ	98,7±11,3	~1,0	+++	+

Примітка. Дивись примітку до таблиці 1.

Методи руйнування клітин мікроорганізмів, такі як МШМЛ, МЛЛ, МТЛ, МЛАБ активно застосовуються багатьма дослідниками при проведенні генотипування (визначення ПП і АПДФЕР ХрДНК). Наші експерименти щодо випробовування ефективності цих методів РКМ на штаммах стафілококів і сальмонел, не може дозволити визначити метод, що міг би претендувати на роль універсального. Кожен із вищезазначених методів має свої переваги і недоліки. Тому вибір одного із декількох методів РКМ для подальшого виділення ХрДНК і ПлДНК з метою проведення внутрішньовидового епідеміологічного генотипування ЗІЗ визначається багатьма умовами [11, 16, 18].

МШМЛ – надзвичайно простий і швидкий у відтворенні. Він дозволяє здійснити попереднє визначення ПП (провести перший, попередній етап такого дослідження) у великій кількості штамів: одночасне скринінгове тестування десятків і більшої кількості культур впродовж однієї доби (тривалість технологічного процесу відтворення МШМЛ для однієї групи культур складає близько 3-х годин). Виконання цього першого етапу дозволяє встановити відмінність ПП у різних штамів мікроорганізмів, якщо останні відрізняються за кількістю плазмід та їх розміром. Зручність і точність відтворення цього методу, а також чіткість результатів дослідження значно підвищувалась завдяки авторській модифікації технології дослідження, яка дозволила усунути причини переваження електрофоретичних профілів (ЕФП). Запропоноване нами нововведення полягало в проведенні додаткового центрифугування суспензії лізованих клітин з обов'язковою присутністю в пробірці фрагменту пластикової

зубочистки (або будь-якого іншого об'єкту із хімічно інертного матеріалу для механічної фіксації), що дозволяло легко звільнитись від згустку слизу - комплексу клітинного детриту. Однак, і цей модифікований варіант МШМЛ не дозволяв отримувати достатньо чистих препаратів ПлДНК для подальшого визначення їх спорідненості за допомогою сайт-специфічного рестрикційного аналізу (РА) [1]. Крім того, цим методом неможливо виявити малі за розміром і малокопійні плазмідні.

МЛЛ і МТЛ при відтворенні є більш тривалими і трудомісткими методами РКМ та виділення ПлДНК, в порівнянні з МШМЛ. В теперішній час вони визнані класичними для отримання достатньої кількості високоочищених препаратів плазмід, в т. ч. і для подальшого ендонуклеазного аналізу з метою визначення спорідненості останніх. Тому, МЛЛ і МТЛ доцільно використовувати на другому етапі (остаточного визначення ПП) з метою генотипування штамів ЗІЗ [1, 2, 11]. Саме МЛЛ і МТЛ найбільш придатні для відтворення великомасштабних технологій виділення малокопійної ПлДНК, що підтверджується і нашими експериментальними даними - визначеним показником КЗ ДНК. Таким чином, МЛЛ і МТЛ дозволяють досліджувати навіть криптичні, низькокопійні та малі за розміром плазмідні у мікроорганізмів різних таксономічних груп. Метод МЛЛ застосовується переважно більшістю авторів і вважається придатним для виділення лише ПлДНК. На противагу йому, МТЛ є більш уніфікований і може бути використаний як для виділення ПлДНК, так і ХрДНК. Остання ж необхідна для дослідження порівнюваних геномів: нуклеотидного складу (моль.% Г+Ц), гомологічності (% гомології дуплексних утворень – ДНК-ДНК-, ДНК-РНК-гібридів), секвенування окремих фрагментів або повної послідовності ХрДНК, тощо [1, 2, 4, 11, 16, 19]. Застосування ГТМ і КПМ також не було ефективним - за їх допомогою вдавалось руйнувати менше 8% клітин стафілококів і близько 34-37% клітин сальмонел (табл.1 і 2). Проте, для визначення спорідненості геному на основі АПДФЕР ХрДНК МТЛ, ГТМ, МШМЛ, МЛЛ є неприйнятними, тому що технології їх відтворення передбачають отримання ХрДНК в розчині. Як відомо, в рідкій фазі неможливо уникнути дії руйнівних зсувних векторних сил, що порушують цілісність дуже великої і чутливої до осьового навантаження макромолекули ДНК (у бактерій співвідношення між довжиною і діаметром ХрДНК складає наближено 10^5). За таких умов відбуваються зсувні самовільні порушення цілісності - розриви і, як їх наслідок, формуються передумови для помилок при визначенні кількості та положення сайтів специфічної ендонуклеазної рестрикції. Додамо, що такі розриви виникають не в випадкових місцях, а відбуваються в "критичних" ділянках, при цьому, утворюються майже рівні за розміром фрагменти ДНК. Цікаво, що їх розмір збільшується прямо пропорційно зростанню іммобілізуючій (стабілізуєчій) в'язкості розчину (неопубліковані автором результати досліджень). Науковцями різних країн світу проводяться розробки методів РКМ із використанням технологій, які дозволяють стабілізувати цілісність ХрДНК [18]. Результати наших досліджень підтверджують, що МЛАБ (технологія якого передбачає стабілізацію ХрДНК в агарозних блоках) є досить простим і ефективним РКМ для виділення цілих неушкоджених хромосом, тоді як всі інші експериментально випробувані нами методи РКМ (ГТМ, КПМ, УЗМ, МШМЛ, МЛЛ, МТЛ) не дають такого результату. Окрім того, використання МЛАБ додатково забезпечує: технологічну зручність для маніпуляції дослідженими зразками, їх подальшого очищення, сайт-специфічного розщеплення при обробці ендонуклеазами, тривалого зберігання зразків; умови для звільнення зразків ДНК від ПлДНК (яка елімінується із агарозних блоків) і не ускладнює оцінку результатів АПДФЕР ХрДНК.

Нам не вдалося створити універсальний метод РКМ різних таксономічних груп, що обумовлено і невдачею в підборі єдиного гідролітичного ферменту для розщеплення різних типів клітинної стінки мікроорганізмів. Наслідок цього – відсутність достатньо ефективного, уніфікованого літичного розчину для РКМ з монотипною рецептурою приготування (вмістом буферу, рівнем осмотичного тиску, типом та концентрацією гідролітичного ферменту, тощо). Навпаки, саме необхідність підбору групспецифічних для мікробів літичних систем була нами продемонстрована на прикладі РКМ роду *S. aureus*. Всі апробовані нами методи РКМ з літичними розчинами, до складу яких входив лізоцим для руйнування пептодогліканового

остову клітинної стінки стафілококів, виявились абсолютно неефективними, але достатньо ефективними для руйнування клітин сальмонел (очевидно, і інших ентеробактерій) з метою подальшого визначення виділення і дослідження ПлДНК і ХрДНК. Лише заміна в літичних розчинах лізоциму на лізостафін обумовила руйнування більше 99% клітин бактерій виду *S. aureus* subsp. *aureus* з достатньою концентрацією звільнених ПлДНК і ХрДНК (табл. 1).

Всі 7 досліджених нами методів РКМ були більш ефективними ($p < 0,05$) для руйнування грамнегативних паличок – ентеробактерій, а ніж при руйнуванні грампозитивних коків – стафілококів.

Висновки

Із семи експериментально апробованих технологій руйнування клітин мікроорганізмів найбільш ефективними (за показниками: % зруйнованих клітин бактерій, концентрація звільненої ДНК, рівень цілісності молекул плазмідної та хромосомної ДНК) для застосування з метою генотипування є методи швидкого міні-лізису (МШМЛ), тритонового лізису (МТЛ) та лізису в агарозних блоках (МЛАБ).

Список літератури

1. Бергквист П., Харди К., Оудега Б. и соавт. Плазмиды. Методы: Пер. с англ./ Под ред. К. Харди. –М.: Мир, 1989. –267 с.
2. Девис Р., Бодстайн Д., Рот Дж. Методы генетической инженерии. Генетика бактерий: Пер. с англ. –М.: Мир, 1984. –176 с.
3. Bingen E.H., Denamur E., Elion J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks // Clin. Microbiol. Rev. –1994. –7. –P. 311-327.
4. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res. –1979. –Vol.7, №6. –P. 1513-1522.
5. Диспергатор ультразвуковой УЗДН-2Т. Техническое описание и инструкция по эксплуатации. ЦФ I.455.001.ТО. –46 с.
6. Биологические мембраны. Методы: Пер. с англ. /Под ред. Дж. Б. Финдея, У.Г. Эванза. –М.: Мир, 1990. –424 с.
7. Методы общей бактериологии: В 3-х т.: Пер. с англ. /Под ред. Ф. Герхарда и др. –М.: Мир, 1984. –Т. 3. – 264 с.
8. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Пер. с англ./Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. –М.: Мир, 1997. –Т. 1. –432 с.
9. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Пер. с англ./Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. –М.: Мир, 1997. –Т. 2. –368 с.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии / Пер. с англ.; Под ред. Т. Маниатиса. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
11. Методы молекулярной генетики и геной инженерии / Мазин А.В., Кузнецов К.Д., Краев А.С. и др. –Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ие, 1990. –248 с.
12. Методы общей бактериологии: В 3-х т. Пер. с англ./Под ред. Ф. Герхарда и др. –М.: Мир, 1984. –Т.1. –536 с.
13. Hossain A.M., Rizk B., Behzadian A., Thorneycroft I.H. Modified guanidinium thiocyanate method for human sperm DNA isolation // Molecular Human Reproduction. –1997. –3, № 11. –P. 953-956.
14. Cox R.A. The use of guanidium chloride in the isolation of nucleic acids // Methods Enzymol. – 1968. –12. –P. 120-558.
15. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ./ Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М: Мир, 1999. –558 с.
16. Klein R.D., Selsing E., Wells R.D. // Plasmids. –1980. – №2. –P. 88-90.
17. Тимченко О.М. Удосконалення молекулярно-генетичних методів внутрішньовидового епідеміологічного типування клінічно-значущих мікроорганізмів різних таксономічних груп:

Автореф. дис канд. мед наук: 03.00.07/ Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України. –Харків, 2004. – 24 с.

18. Анализ генома. Методы: Пер. с англ./ Под ред К. Дейвиса. –М.: Мир, 1990. –246 с.

19. Гинцбург А.Л., Зигангирова Н.А., Романова Ю.М. Современное состояние и перспективы молекулярно-генетических методов в решении задач медицинской микробиологии // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. –1999. -№ 5. –С. 22-26.

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДІВ РУЙНУВАННЯ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ІНТАКТНИХ ФОРМ ПЛАЗМІДНОЇ ТА ХРОМОСОМНОЇ ДНК

Тимченко О.М., Похил С.І.

Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України, м. Харків

Для руйнування клітин бактерій різних таксономічних груп з метою виділення хромосомної і плазмідної ДНК (ХрДНК і ПлДНК) експериментально апробовано сім найбільш поширених методів: ультразвуковий метод (газовокавітаційне дезинтегрування) (УЗМ), гуанідін тиоціонатний метод (ГТМ), К-протеїназний метод (КПМ), метод швидкого міні-лізису (МШМЛ), метод лужного лізису (МЛЛ), метод тритонового лізису (МТЛ), метод лізису в агарозних блоках (МЛАБ). Найбільш ефективними (за показниками: % зруйнованих клітин бактерій, концентрація звільненої ДНК, рівень цілісності молекул ПлДНК та ХрДНК) для генотипування штамів мікроорганізмів є МШМЛ, МТЛ і МЛАБ.

Ключові слова: ефективність методів руйнування клітин, виділення ДНК.

УДК 579.256

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ РАЗРУШЕНИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИНТАКТНЫХ ФОРМ ПЛАЗМИДНОЙ И ХРОМОСОМНОЙ ДНК

Тимченко Е.Н., Похил С.И.

Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины, г. Харьков

Для разрушения клеток бактерий различных таксономических групп с целью выделения хромосомной и плазмидной ДНК (ХрДНК и ПлДНК) экспериментально апробировано семь наиболее распространенных методов: ультразвуковой метод (газовокавитационная дезинтеграция) (УЗМ), гуанидин тиоционатный метод (ГТМ), К-протеиназный метод (КПМ), метод быстрого мини-лизиса (МБМЛ), метод щелочного лизиса (МЩЛ), метод тритонового лизиса (МТЛ), метод лизиса в агарозных блоках (МЛАБ). Наиболее эффективными (по показателям: % разрушенных клеток бактерий, концентрация освобожденной ДНК, уровень целостности молекул ПлДНК и ХрДНК) для генотипирования штаммов микроорганизмов являются МБМЛ, МТЛ и МЛАБ.

Ключевые слова: эффективность методов разрушения клеток, выделение ДНК.

UDC 579.256

COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF METHODS FOR DESTRUCTION OF MICROORGANISMS CELLS TO OBTAIN INTACT FORMS OF PLASMID AND CHROMOSOMAL DNA

Timchenko O.M., Pokhil S.I.

I.Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv

To destruct cells of bacteria from different taxonomic groups with purpose to isolate chromosomal and plasmid DNA (ChrDNA, PIDNA) there were tested experimentally seven the most widespread methods: ultrasonic (gaseous cavitation) disintegration method (USM), guanidinium thiocyanate method (GTM), proteinase K – method (PKM), method of rapid mini-lysis (MRML), method of alkaline lysis (MAL), method of triton lysis (MTL), method of lysis in agarose blocks (MLAB).

MRML, MTL and MLAB are the most efficacious (by percent of destructed bacterium cells, free DNA concentration, integrity level for molecules ChrDNA, PIDNA) for genotyping of microorganisms strains.

Key words: efficacy of methods, cells destruction, isolation of DNA