

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением микробиологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи



Перышкина Кристина Олеговна

**ОПТИМИЗАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
ПЦР-ДЕТЕКЦИИ ГРИБОВ *FUSARIUM GRAMINERUM***

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,

профессор

А.Р. Мавзютов

Научный консультант:



Т.Н. Титова

Уфа – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Общие представления о грибах <i>p. Fusarium</i>	7
1.2. Заболевания, вызываемые, грибами <i>p. Fusarium</i>	8
1.3. Типы проявления болезни	11
1.4. Определение зараженности зерна пшеницы грибами <i>pp. Fusarium</i> и <i>Alternaria</i>	14
1.5. Определение зараженности зерна пшеницы грибами <i>pp. Fusarium</i> и <i>Alternaria</i> методом иммуноферментного анализа	14
1.6. Микологическая идентификация грибов <i>p. Fusarium</i>	16
1.7. Применение метода ПЦР для определения грибов в растительном материале	19
1.8. Методы выделения ДНК. Трудности выделения ДНК из микромицетов	22
1.8.1 Фенол – хлороформная экстракция	23
1.8.2 Выделение ДНК из крови с помощью смолы Chelex	24
1.8.3 Выделение ДНК при помощи магнитных частиц	24
1.8.4 Экстракция силикой	26
1.8.5 Сорбционная экстракция ДНК. Солевая экстракция	27
1.8.6 Спиртовое осаждение	28
1.8.7 Выделение ДНК. Экстракция материала с помощью комплекта «ДНК – сорб – С – М»	29
1.8.8 Выделение ДНК из клинического материала с помощью «АмлиПрам ДНК–сорб – АМ»	30
1.9 Электрофорез	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1 Выделение ДНК. Экстракция материала с помощью комплекта	33

	«ДНК – сорб – С – М»	
2.2	Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	34
2.3	Электрофорез	35
	ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	37
	ВЫВОДЫ	45
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	47
	ПРИЛОЖЕНИЕ	49

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТБЕ – трис-боратный буфер

УФ – ультрафиолет

ДДС – додецилсульфат натрия

ВКО – внутренний контрольный образец

ОКО – отрицательный контрольный образец

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Заболевание фузариоз является одним из наиболее опасных заболеваний для сельскохозяйственных культур (Гагкаева Т.Ю. и др., 2011). Представители рода *Fusarium* поражают сельскохозяйственные растения: ячмень, пшеницу, рожь, овёс, кукурузу, рис и др. Заражение грибом *p. Fusarium* представляет собой тяжелое заболевание. Заражение зерна возбудителями фузариоза приводит к накоплению в нем вторичных токсичных метаболитов грибов-микотоксинов. Актуальность изучения и выявления токсигенных грибов и продуцируемых ими токсинов признана во всем мире и связана с их чрезвычайно высокой опасностью для здоровья человека и животных (Стахеев А.А, 2013). Заражение семян патогенными видами грибов снижает энергию прорастания и всхожесть. Вредоносность в значительной степени зависит от глубины локализации мицелия и количества пораженных семян. Когда партии идут на продовольствие и кормовые цели, важен видовой состав патогенов.

По данным ФГБУ «Россельхозцентр», в 2016 году в двух округах (Южно-Федеральный Округ и Северокавказский округ) площадь заражения озимых колосковых культур заболеванием фузариоз достигла 999,3 тыс. га

Следствием заражения является снижение количества и качества урожая, и, как следствие, экономический ущерб.

Поэтому, важно вовремя выявить заболевание фузариоз.

Существуют ряд методов для обнаружения и идентификации токсигенных грибов в зерне.

На сегодняшний день метод ПЦР и его разновидности считаются самыми надежными при определении грибов в растительном материале (Феоктистова А.С., 2012).

Цель исследования. Анализ методов пробоподготовки и выделение ДНК для контроля зерна. Выявление их преимуществ и недостатков и обоснование оптимальных методов.

Задачи исследования

1. Выделить геномную ДНК *Fusarium graminearum* из зараженной пшеницы, содержащую специфичный фрагмент ДНК.
2. Определить концентрацию геномной ДНК в пробе.
3. Освоить методы выделения ДНК. Сравнить их преимущества и недостатки.

Практическая значимость.

Предложенный подход позволит улучшить и облегчит контроль зерна. Методика применима для широкого использования, не требует дорогостоящей реагентки и непродолжительна во времени. Результаты проделанной работы могут быть применимы в научно – внедренческих лабораториях для контроля зерна.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие представления о грибах р. *Fusarium*

Как известно, большинство злаковых растений имеют соцветие колос, также встречаются соцветия типа метелка (овес, рис, сорго, просо) и початок (кукуруза). Обычно используемое название заболевания «заболевание фузариоз колоса, початка» отражает, как правило, с симптомами, связанных с формированием массового спороношения на поверхности растительной ткани. Заражение зерна, даже значительное, может сопровождаться полным отсутствием симптомов заболевания фузариоз или слабым проявлением на колосковых чешуях/початках.

Грибы рода *Fusarium* образуют хорошо развитый мицелий белого, розового или красного цвета. Имеются микроконидии, макроконидии, редко хламидоспоры. Макроконидии многоклеточные веретеновидно-серповидные. Микроконидии овальные грушевидные. Растут на среде Чапека в виде пушистых колоний (Т. Ю. Гагкаева и др., 2011).

Патогенез и клиническая картина. Грибы широко распространены, особенно на растениях. У лиц с иммунодефицитом грибы могут поражать кожу, ногти, роговицу и другие ткани (*F. moniliforme*, *F. anthropilum*, *F. chlamydosporum*). Развиваются лихорадка, появляются высыпания. Очаги поражения локализуются в основном на конечностях.

При пониженных температурах на злаках развивается психрофильный гриб *F. sporotrichiella*, продуцирующий микотоксин. Употребление в пищу таких злаков, перезимовавших под снегом, вызывает микотоксикоз (алиментарно-токсическую алейкию). Микотоксикозы вызываются также при употреблении изделий из зерна, пораженного *F. graminearum*: происходит отравление «пьяным хлебом» - поражение ЦНС с нарушением координации движений.

Микробиологическая диагностика. Исследуют ногти, кожу, подкожную клетчатку, роговицу, кровь, кончик постоянного катетера, рвотные массы, биоптаты тканей. Выделяют грибы и определяют их токсины. Применяют РИФ. На питательных средах растут пушистые или ватообразные колонии белого цвета, которые по мере старения приобретают сиренево-синий, розово-красный, желтый или зеленый цвет. Грибы образуют мицелий, микро- и макроконидии. Старые культуры могут образовывать хламидоспоры. Иногда ставят ПЦР (В.В. Зверева и др., 2016).

Колонии быстрорастущие. Воздушный мицелий хорошо развит, пушистый, хлопьевидный, бело-розовый, розовый, с возрастом в центре появляются желтые оттенки. Реверс розовый, малиново-красный, винно-красный, в центре более темный, часто с радиальными лучами. Конидиеносцы образуются на гифах воздушного мицелия, в дальнейшем обильно ветвятся. Конидиогенные клетки – монофалиды. Спородохии с возрастом кирпично-красные, темнооранжевые. Макроконидии веретеновидно-серповидные, эллиптически изогнутые, большей частью с одинаковым диаметром на протяжении всей длины, в основном с 5 перегородками (иногда с 3–6). Апикальная клетка постепенно сужающаяся, конусообразная, слегка искривленная. Базальная клетка с отчетливо выраженной ножкой. Размеры макроконидий с 5 перегородками $4\text{--}7 \times 40\text{--}60$ мкм. Микроконидии отсутствуют. Хламидоспоры формируются в гифах, макроконидиях, бывают одиночные, в цепочках или кластерах, окрашенные, часто отсутствуют (Ули- Маттила и др., 2007).

1.2. Заболевания, вызываемые, грибами *p. Fusarium*

Заболевание фузариоз зерна – широко распространенное в мире заболевание, снижающее урожай и качество сельскохозяйственной продукции.

В России первые эпифитотии заболевания фузариоза зерновых культур были отмечены на Дальнем Востоке в 1880–1890-х годах (Т.Ю. Гагкаева и др., 1994).

Пищевые микотоксикозы - заболевания, которые вызывают органические природные соединения сложной химической структуры (кумарины, алкалоиды, пептиды), являющиеся вторичными метаболитами почвенных микроскопических грибов, паразитирующих на различных растениях. При попадании микотоксинов в организм млекопитающих, включая человека, они оказывают токсическое действие. Микотоксины влияют на обмен веществ человека на клеточном и молекулярном уровне, проявляя в том числе и мутагенную активность. Некоторые микотоксины имеют канцерогенную направленность действия: афлатоксин, зеараленон, патулин, охратоксин и фуманизин.

К фузариотоксикозам относят отравления при использовании в пищу зерновых (пшеница, ячмень, овес, рис, кукуруза), произрастающих в жарких регионах всех континентов, пораженных грибами рода *Fusarium*, почти все разновидности которого токсичны для человека.

К фузариотоксикозам относятся отравления «пьяным хлебом» и алиментарно-токсическая алейкия.

Отравление «пьяным хлебом» обусловлено заражением зерновых грибом *Fusarium graminearum*. Даже в случае однократного употребления хлеба, содержащего токсины этого гриба, проявляются симптомы, характерные для тяжелого алкогольного опьянения (Воронин Н.С., 1890–1892).

Алиментарно-токсическая алейкия встречается при употреблении в пищу хлеба, приготовленного из перезимовавшего в поле зерна (просо, пшеница, рожь, ячмень, овес). В процессе длительного пребывания в поле зерно подвергается массивному заражению грибами *Fusarium sporotrichioides*.

Основными клиническими проявлениями заболевания являются септическая ангина (воспалительное поражение миндалин, мягкого нёба, задней стенки глотки), геморрагическая сыпь и подкожные кровоизлияния на туловище и конечностях, мелкие серозно-кровоянистые высыпания на слизистой оболочке рта и языка, лихорадка с температурой тела 39-41 °С. Возможны также носовые, кишечные и маточные кровотечения. Летальность может достигать 60 % и более.

Эрготизм вызывается при употреблении в пищу хлеба и других зерновых изделий, содержащих остатки спорыньи (грибной ткани) микроскопического гриба *Claviceps purpurea*. В зависимости от количества поступивших микотоксинов эрготизм может протекать в нескольких формах. Судорожная форма характеризуется генерализованным мышечным гипертонусом, поражением нервной системы (расстройство сознания, галлюцинации), тошнотой, рвотой, кишечной коликой. При гангренозной форме эрготизма ведущими симптомами являются расстройства периферического кровообращения (особенно в области нижних конечностей), напоминающие облитерирующие сосудистые поражения с последовательным развитием ишемии, некроза и гангрены. Может также наблюдаться смешанная форма отравления.

Профилактика микотоксикозов включает борьбу с сельскохозяйственными вредителями и гигиенический мониторинг уровня загрязнения сырья и пищевых продуктов. (В. И. Архангельский и др., 2012).

Возбудителями оппортунистических микозов являются условнопатогенные грибы родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Candida* и др. Они вызывают заболевания у лиц с трансплантатами, на фоне сниженного иммунитета, нерациональной длительной антибиотикотерапии, гормонотерапии, использования инвазивных методов исследования. Находятся в почве, воде, воздухе, на гниющих растениях; некоторые входят в состав факультативной микрофлоры человека (например, грибы рода *Candida*) (В.В. Зверева и др., 2016.).

1.3. Типы проявления болезни

Заболевание фузариоз початков кукурузы проявляется на поверхности пораженного початка в виде бледно-розового налета. Пораженные зерновки кукурузы становятся тусклыми, грязно-бурыми, с розовыми пятнами, легко крошащимися. Как это обычно для заболеваний фузариозной этиологии, если в початке кукурузы рядом с очагом фузариозного поражения формируются зерна без признаков заболевания, то они также являются инфицированными (Headrick, Pataky, 1991). Суммарное количество пораженных зерен после обмолота початков в 2–3 раза выше, чем при визуальном осмотре (Иващенко и др., 2006). Симптомы заболевания на соцветиях зерновых колосковых культур проявляются в виде обесцвечивания колосковых чешуй, хорошо заметного в начальный период созревания растений на фоне еще зеленой окраски здоровой ткани. При благоприятных условиях для развития заболевания на колосковых чешуйках появляется налет мицелия, имеющий, в зависимости от вида возбудителя, розово-оранжевую или красновато-кирпичную окраску (Волкова, 2013).

Виды фузариевых грибов различаются по скорости спороношения, и, в зависимости от патогена, симптомы могут быть хорошо заметны, или вовсе отсутствовать. При благоприятных условиях такие виды, как *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. Heterosporum*, легко формируют окрашенные макроконидии как на искусственной питательной среде, так и в естественных условиях на растительной ткани. В районах распространения этих видов появляется заметное спороношение на колосковых чешуйках в виде окрашенной массы макроконидий. Подсыхая, макроконидии разносятся ветром, с каплями воды, насекомыми и являются источником инфекции в период вегетации растений. Эта масса легко соскабливается с поверхности колосковой чешуйки, в отличие от встречающегося (особенно на колосьях ржи) розового окрашивания не фузариозной природы. Однако многие виды грибов макроконидий не образуют или редко образуют, и вместо хорошо

заметного розового налета на колосковых чешуйках развиваются слабозаметные или нетипичные симптомы заболевания – некротическое потемнение колосковых чешуй, глазковая пятнистость. Эти симптомы при обследованиях посевов легко спутать с проявлениями других заболеваний, вызываемых грибами *pp. Pyrenophora, Cochliobolus, Cladosporium, Alternaria*. Заболевание фузариоз протекает без видимых признаков, например при заражении растений грибами видов *F. poae, F. sporotrichioides, F. tricinctum*, и лишь при анализе собранного зерна выявляются высокая зараженность патогенами и присутствие микотоксинов.

Когда созревают генеративные органы зерновых злаковых культур, в большинстве случаев приобретают светло-соломенный цвет и признаки поражения грибами, даже при наличии спороношения на чешуйках, становятся невыраженными. Поэтому наилучшим периодом выявления больных растений в поле являются 18–24-е сутки после цветения, когда на фоне еще зеленой ткани хорошо, заметно спороношения.

На симптоматику влияют вид растения и его устойчивость к заболеванию. Распространение гриба по колосу пшеницы может происходить по поверхности колосков от одного к другому, и мицелий может быть виден на поверхности колоса. С поверхностных чешуй грибок распространяется по тканям генеративных органов, проникает внутрь формирующихся зерновок. В самом начале оккупирует перикард и алейроновый слой, затем проникает в эндосперм (Иващенко и др., 2004). Гифы распространяются в эндосперме, для питания использует белки и крахмал. В зернах пшеницы грибок проникает и в зародыш, а в визуально здоровых зерновках заражение зародыша, как правило, не происходит (Bechtel et al., 1985). У зараженного ячменного зерна под микроскопом выявляется обильное присутствие гриба в цветковой пленке, в эндосперме и зародыше (Schwarz, 2003). Основным путем распространения гриба по колосу пшеницы – по сосудистой ткани через ось колоска в стержень колоса (Bushell et al., 2003). Внутри стержня грибок развивается в направлении от инфицированного колоска и может

продвинутся под колос в верхнее междоузлие. Сосудистую ткань, вызывая уплотнение стенок сосудов и их закупорку, грибок значительно изменяет, приводя к некротизации ткани. Разрушение проводящей ткани стержня колоса часто приводит к отмиранию колосков над местом инфицирования пшеницы. Для пшеницыирижи характерно видимое поражение нескольких рядом расположенных колосков. У овса и ячменя пораженные колоски часто расположены фрагментарно, что предполагает устойчивость этих культур к распространению гриба по генеративному органу (Bushell et al., 2003). Есть все основания считать, что для ячменя и овса более характерно многополярное, экзогенное первичное заражение колосков. Для этих зерновых культур особенно характерно бессимптомное течение инфекционного процесса, что часто создает ложное впечатление об отсутствии фузариозного заболевания (Шипилова, 1994).

Фузариозное зерно появляется в результате заражения грибами *F. graminearum*, *F. culmorum*, но даже в этом случае в образце зерна всегда присутствуют зерна как с типичными признаками фузариоза зерна, так и несущие внутреннюю инфекцию без видимых симптомов поражения.

Количество пораженных зерен может быть весьма значительным при почти отсутствии видимых симптомов.

Степень инфицированности зерна зависит от вида и агрессивности возбудителя, но также и от плотности его популяции, сроков заражения и условий окружающей среды. В лабораториях, контролирующих качество зерна, для выявления фузариозных зерен используют «Методические указания по учету фузариоза колоса и визуальному определению зараженности зерен в пшенице и ячмене» (1996 г.), утвержденные Министерством сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации и Госкомсанэпиднадзором России.

1.4. Определение зараженности зерна пшеницы грибами *pp. Fusarium* и *Alternaria*.

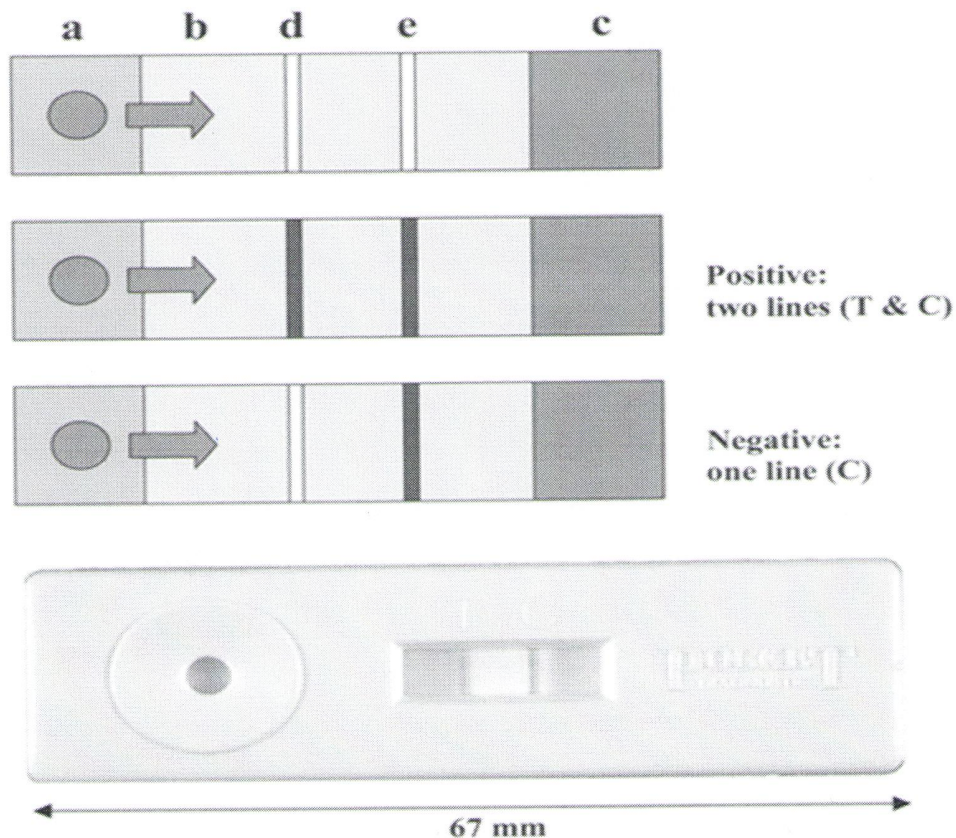
Образцы подвергают микологическому анализу для выявления и определения видов грибов, продуцирующих микотоксины. После поверхностной стерилизации по 100 зерен из каждого образца раскладывают на питательную среду (картофельно-сахарозный агар), разлитую в чашки Петри. Через 7–10 суток инкубации при 23°C учитывают количество зерен, вокруг которых наблюдается рост колоний грибов *pp. Fusarium* и *Alternaria*. Зараженность образцов рассчитывают, как отношение числа зерен, инфицированных определенной группой грибов, к общему числу анализированных. Видовую идентификацию грибов проводят с использованием классических определителей. Частоту выявления определенного вида устанавливают по отношению числа образцов зерна, в которых данный вид встречается, к общему числу анализируемых образцов. Долю конкретного вида в комплексе патогенов *pp. Fusarium* и *Alternaria* рассчитывают, как отношение числа зерен, зараженных данным видом, к общему числу зерен, зараженных грибами рода. Для грибов *p. Fusarium* зараженность зерна 1–4 % считается низкой, 5–10 % – средней, 11–15 % – высокой, более 15 % – очень высокой. Для видов *p. Alternaria* в связи с их меньшей вредоносностью используют иные градации: 1–15 % – низкая зараженность, 16–50 % – средняя, более 50 % – высокая.

1.5. Определение зараженности зерна пшеницы грибами *pp. Fusarium* и *Alternaria* методом иммуноферментного анализа

Иммуноферментный анализ состоит из двух основных этапов: иммунной и ферментативной реакций. Иммунная реакция заключается в специфическом связывании характерного для данного микроорганизма антигена с диагностическим антителом. Ферментативная реакция

необходима для обнаружения этого связывания. Как правило, она сопровождается изменением цвета, причём степень этого изменения может быть использована для определения количества присутствующего антигена.

Основанные на иммуноферментном анализе методы широко применяются для обнаружения вирусов (в том числе поражающих растения) и значительно реже — для идентификации грибов и бактерий. Основной причиной этого является трудность получения антител с необходимой специфичностью: строение клеточных стенок грибов и бактерий гораздо сложнее, чем вирусного капсида, к тому же может изменяться в ходе их жизненного цикла. В результате получаемые антитела могут оказаться специфичны как сразу к большой группе видов, так и исключительно к отдельным жизненным формам данных микроорганизмов. Тем не менее, основанные на ELISA методы идентификации фитопатогенных грибов всё же разрабатываются: например, существует метод идентификации спор уже упоминавшийся в данной статье твёрдой головни (Kellerer, 2006).



Растительный экстракт помещается на площадку (а), которая содержит латексные шарики, покрытые специфическими антителами; смесь мигрирует вдоль мембраны (b) к абсорбирующей поверхности (с). При этом имеющиеся в растворе целевые антигены связываются со специфичными антителами на латексных шариках. Мембрана содержит полосу антител, отличающихся необходимой специфичностью (измерительную полосу) (d) и полосу других антител, которые связываются с первыми антителами (контрольную полосу). Латексные шарики, содержащие связанный антиген, задерживаются в тестовой зоне, давая видимую линию, тогда как излишние латексные шарики, которые не содержат антигена, задерживаются в контрольной зоне, показывая, что анализ работает. Наличие двух линий соответствует положительному результату (positive), наличие только одной линии (контрольной) говорит о негативном результате (negative) (Danks и др., 2000).

1.6. Микологическая идентификация грибов р. *Fusarium*

Анализ видового состава грибов проводится на первичном уровне и не предполагает последующего изучения свойств и признаков выделенных культур грибов, разнообразие состава миксомицетов оценивают на уровне рода. Этого достаточно для прогнозирования развития заболеваний и разработки мер по ограничению их численности. Если из образца выделен один или несколько сходных изолятов грибов этого рода, их обозначают *Fusariumsp.* (*Fusariumspecies*), если речь идет о изолятах рода, то указывают *Fusariumspp.* (*Fusariumspeciesplural*). Микрокопирование в таком случае не требуется. В случае конкретной необходимости установления видового разнообразия патогенов его должен проводить специалист с соответствующим образованием, так как границы морфологических признаков видов в существующих определителях часто размыты и это приводит к ошибкам идентификации. Для видовой идентификации культуры гриба необходимо оценить совокупность макроморфологических

(культуральных) и микроморфологических признаков. Строение и обилие микроструктур грибов анализируют с использованием светового фазово-контрастного микроскопа. Микрокопирование культуры *insitu*. Строение и способ формообразования конидий можно оценить под микроскопом с увеличением 100–200×. Лучше всего использовать культуры на бедных питательных средах. Чашки Петри, предварительно подняв окуляр, помещают на столик микроскопа и просматривают культуру. Такой способ часто необходим для идентификации группы грибов *Gibberellafujikuroi*, когда важно оценить формирование микроконидий в головках или различной длины цепочках.

Микроскопирование культуры в капле воды.

Применяют метод «раздавленной капли». На хорошо вымытое и высушенное предметное стекло микробиологической иглой в каплю жидкости помещают грибную культуру, стараясь взять фрагмент, содержащий разные микроструктуры. Препарат накрывают покровным стеклом, по возможности избегая появления воздушных пузырей, и рассматривают сначала при малом увеличении (150–200×), а потом при большом (400–600×). Если сразу видно, что присутствует только воздушный мицелий, то лучше не тратить время на просмотр этого препарата, а визуально просмотреть культуру гриба и приготовить новый из участка, где предполагается наличие таксономически важных структур. Просмотр макроконидий из спородохий играет важную роль, поскольку они имеют типичные для вида форму и размеры. Но часто одной этой информации недостаточно для идентификации и необходимо просмотреть мицелиальные препараты для установления типа конидиеносцев, способа образования конидий и хламидоспор. Строение структур оценивают методом «агарового блока». Из культуры гриба стерильным скальпелем вырезают кусочек агарового блока (5–10 × 5–10 мм) с культурой гриба и помещают на предметное стекло. Далее аккуратно добавляют каплю жидкости и накрывают покровным стеклом. Этот метод дает возможность просмотра

морфологических структур в исходном, не разрушенном состоянии. Для улучшения видимости конидий и перегородок в них на предметное стекло помещают каплю красителя. Можно использовать метиленовый синий. К 100 мл воды добавляют 0,5–1 мл 0,01 % водного или спиртового раствора метиленового синего. Срок хранения базового раствора метиленового синего в защищенном от света месте не ограничен. Метод разведения спор. Поскольку фузариевые грибы быстро растут и имеют обильный воздушный мицелий, а кроме того, нередко случаи выделения нескольких видов грибов из одной зерновки, то для корректной идентификации вида необходимо использовать изоляты, полученные из одной споры. Суспензию конидий или аскоспор готовят в стерильной воде, подсчитывают концентрацию спор под микроскопом при малом увеличении (100–150×) и доводят до концентрации 10–30 спор в капле. На поверхность агаризованной среды с ограничителем роста (2×104 Triton X100) наносят каплю суспензии так, чтобы в чашку внести 10–20 спор. Стеклянным шпателем распределяют суспензию по поверхности агаризованной среды. Через 3–5 суток отбирают отдельно растущую колонию гриба. Для получения моноспоровых изолятов лучше всего приготовить чашки Петри за 1–3 суток до использования, чтобы поверхность агаровой среды слегка подсохла, и распределение капли суспензии было более равномерным. Если спородохии и пионноты отсутствуют, готовят суспензию из смеси гиф и конидий, профильтровывают ее через фильтр. Контролируют концентрацию конидий под микроскопом и шпателем распределяют каплю фильтрата по поверхности агара. В этом случае лучше использовать 2 % водный агар, разлитый в чашки Петри тонким слоем. На следующие сутки под микроскопом (10×) в проходящем свете просматривают чашки с нижней стороны и отмечают маркером проросшие, отдельно расположенные конидии гриба. Затем стерильной иглой отбирают кусочек агара с конидией гриба и переносят на богатую питательную среду. Питательные среды для выделения и идентификации грибов *p. Fusarium*. Макроморфологические и морфологические признаки в

значительной степени зависят от питательной среды и условий культивирования культур грибов. Поэтому оценивать признаки грибов нужно при выращивании на той среде и придерживаясь тех условий, которые описаны в используемом определителе. Как правило, для описания культуральных (макро-морфологических) характеристик гриба – обильность и цвет воздушного мицелия, наличие пигмента – используют среды на основе картофельного отвара. Для оценки микро-морфологических признаков используют агаризованные среды с низким содержанием углеводов, на которых гриб образует стелющийся по поверхности, слабо развитый, паутинистый, бесцветный мицелий, морфологические особенности которого (размеры, форма, микро- и макроконидий, хламидоспоры, а также способы их формирования) легко учитываются *insitu*.

Синтетическая среда Ниренберг (Synthetic Nutrient Agar, SNA). Состав среды в граммах на 1 л дистиллированной воды: KNO_3 – 1, KH_2PO_4 – 1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5, KCl – 0,5, глюкоза – 0,2, сахароза – 0,2, агар-агар – 15. Кусочки стерильной фильтровальной бумаги (1–2 см) раскладывают на поверхности автоклавированной и разлитой по чашкам Петри питательной среды для стимуляции спороношения. Также можно вырезать кусочек агара с культурой гриба, поместить на предметное стекло с каплей воды и, накрыв покровным стеклом, анализировать микроструктуры под большим увеличением (до 100×).

1.7. Применение метода ПЦР для определения грибов в растительном материале

В последние годы для идентификации и детекции фитопатогенных микроорганизмов все чаще применяется метод ПЦР. Он превосходит традиционные методы по специфичности, чувствительности, скорости проведения анализа, производительности, и служит их существенным

дополнением. Кроме того, его применение не требует глубоких знаний биологии и морфологии исследуемых микромицетов (Рязанцев, и др., 2008).

Метод ПЦР обладает рядом преимуществ:

1. Прямое определение наличия возбудителей. Многие методы диагностики, например иммуноферментный анализ, выявляют белки-маркеры, являющихся продуктами жизнедеятельности агентов, что позволяет лишь свидетельствовать о наличии инфекции.

2. Высокая специфичность метода ПЦР обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется фрагмент ДНК характерный только для данного возбудителя. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получить ложные результаты.

3. Высокая чувствительность. Метод ПЦР позволяет выявлять единичные клетки бактерий или вирусов. Для осуществления реакции достаточно всего одной копии искомой ДНК (РНК) - последовательности в исследуемом материале, что позволяет использовать ее в тех случаях, когда серологические исследования не дают положительного результата вследствие крайне низкого микробного титра.

4. Универсальность процедуры выявления различных возбудителей. Материалом для исследования служит ДНК возбудителя. Метод основан на выявлении фрагмента ДНК или РНК, являющегося специфичным для конкретного организма. Сходство химического состава всех нуклеиновых кислот позволяет применять унифицированные методы проведения лабораторных исследований. Это дает возможность диагностировать несколько возбудителей из одной биопробы. В качестве исследуемого материала могут использоваться различные биологические выделения (слизь, моча, мокрота), соскобы эпителиальных клеток, кровь, сыворотка.

5. Высокая скорость получения результата анализа. Для проведения ПЦР-анализа не требуется выделение и выращивание культуры возбудителя, что занимает большое количество времени.

Выравнивание последовательностей нуклеотидов проводят с применением программы AlignX пакета Vector NTI Suite 8,0. Анализ нуклеотидных последовательностей для подбора олигонуклеотидов осуществляют с помощью программы Oligo 6,71. Праймеры подбирают длиной 18-25 п.н. с температурой плавления 68- 71°C таким образом, чтобы фланкируемая ими нуклеотидная последовательность составляла около 350-400 п.н. При использовании в ПЦР реакции внутреннего контроля (ВК), длина ампликона которого должно составлять 560 п.н., разница в длинах ампликонов специфического продукта и ВК обеспечивает их четкое разделение при проведении электрофоретического анализа. Видоспецифичность сконструированных праймеров предварительно проверяют с помощью программы BLAST (Абрамова, 2008).

Проведение ПЦР.

ПЦР проводят на амплификаторе «Терцик» ТП4- ПЦР-01 (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия). Для видов рода *Fusarium* реакционная смесь объемом 35 мкл должна содержать 3,5 мкл 10x буфера (750 мМТрис-НСl, рН 8,8; 200 мМ сульфат аммония, 0,1% Твин-20), 1 мМ каждого dNTP, по 12,5 пмольпраймеров, 2,5 ед. Таq-полимеразы и 5 мкл раствора ДНК (как правило, около 3-5 нг ДНК на реакцию). При проведении ПЦР с ВК в указанную реакционную смесь добавляют 0,002 пгплазмиды ВК и по 12,5 пмольпраймеров для ВК. Преимущественная амплификация специфического продукта происходит за счет оптимизации концентрации матрицы ВК в реакционной смеси. Для определения фоновой флуоресценции используется та же реакционная смесь, только без добавления Таq-полимеразы. Для снижения уровня неспецифического отжига праймеров до начала реакции амплификации компоненты смеси пространственно разделяют слоем

парафина, при этом нижняя часть смеси содержит праймеры, зонд, буфер и dNTPs, а верхняя - Taq-полимеразу и ДНК.

Специфичность праймеров для рода *Fusarium* проверяли по оптимизированной программе: (93°C - 90 сек) – 1 цикл; (93°C - 20 сек, 64°C, 67°C или 70°C - 10 сек) – 5 циклов; (93°C - 1 сек, 64°C, 67°C или 70°C - 10 сек) – 40 циклов. Оптимальными считаются праймеры, с которыми при температуре отжига 64°C происходит специфичная амплификация ПЦР-продукта, и которые не теряют свою эффективность при температуре отжига 67°C. Эффективность ПЦР оценивали по интенсивности свечения полос в геле после электрофореза продуктов амплификации. FLASH- ПЦР для рода *Fusarium* проводили по программе: (93°C - 90 сек) - 1 цикл; (93°C - 20 сек, 64°C - 5 сек, 67°C - 5 сек) – 5 циклов; (93°C - 1 сек, 64°C - 5 сек, 67°C - 5 сек) – 40 циклов. Температура отжига праймеров для амплификации специфических фрагментов ДНК рода *Fusarium* подбирают в рамках программы: (93°C - 130 сек) - 1 цикл, (93°C - 15 сек, 60°C-67 °C - 10 сек, 72°C - 15 сек) - 40 циклов, (72°C - 190 сек) - 1 цикл.

1.8. Методы выделения ДНК

Трудности выделения ДНК из микромицетов

Основная проблема на этапе выделения ДНК из грибов заключается в трудности разрушения их клеточной стенки, которая существенно отличается от клеточной стенки бактерий и содержит глюканы, хитин, белки, обуславливающие устойчивость к действию большинства лизирующих агентов.

Для лизиса клеточной стенки и более полного экстрагирования ДНК из клеток гриба использовали литические препараты, разрушающие компоненты клеточной стенки микромицетов (Гришин и др., 2002).

1.8.1. Фенол – хлороформная экстракция

Для выделения и очистки ДНК из зерна пшеницы использовали классическую фенол – хлороформную экстракцию. Этот метод универсален, способен обеспечить высокую степень чистоты ДНК и обладает хорошей воспроизводимостью. Полученные этим методом препараты стабильны, могут храниться при 40 градусах в течении нескольких лет. Это многоэтапные процедуры, которые предусматривают диссоциацию хромосомных нуклеотидных комплексов с помощью применения детергентов, разрушение (лизис) клеточных структур, экстрагирование белков органическими растворами, отделение водной фазы, содержащей ДНК.

В результате получается очищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

В данном методе отбирают необходимое количество пробирок и добавили эюлирующий буфер по 2 мл. Далее пробы тщательно перемешивают на вортексе и помещают в термостат на 1 час при температуре 65°C. Центрифугируют 10 мин для осаждения грубого осадка и используют для выделения ДНК надосадочную (500мкл) жидкость, перенеся ее в новую пробирку. В каждую пробирку отдельным наконечником добавляють компоненты-ЭДТА по 5мкл. Перемешивают на вортексе и оставляют в штативе на 5 мин. Далее добавляють фенол и хлороформ по 250 мкл и осаждают сорбент в пробирках центрифугированием на 10 мин, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой из проб, перемешивают на вортексе. Снова добавляють в пробы хлороформ по 250 мкл и перемешивают на вортексе. Центрифугируют 5 мин.

Над осадочная жидкость, содержащая очищенную ДНК, готова к постановке ПЦР.

1.8.2. Выделение ДНК из крови с помощью смолы Chelex

Основная процедура выделения включает в себя очистку от металлосодержащих соединений и протеинов с последующим кипячением образца в присутствии Chelex 100, затем супернатант непосредственно добавляют в ПЦР смесь.

В центрифужную пробирку на 2 мл вносят 1 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют 5 мкл крови или 3 мматериала с засохшей кровью. Тщательно перемешивают. Инкубируют при тщательном перемешивании 20 мин при комнатной температуре (лучше всего использовать ротатор для центрифужных пробирок). Центрифугируют при 10 000 g 3 мин и удаляют супернатант, оставляя (чтобы не взмутить осадок клеток или ткань) 20-30 мкл. Добавляют 5% раствор Chelex-100 до конечного объема 200 мкл (Chelex в натриевой форме, 5% раствор в стерильной дистиллированной воде). Перед добавлением смолу перемешивают до гомогенного состояния пипеткой с широким отверстием. Инкубируют при 56°C 30 мин и встряхивают в течение 10 сек. Кипятят образец 8 мин при 95°C, встряхивают в течение 10 сек. и центрифугируют при 10 000 g 3 мин. Для ПЦР берут из полученного супернатанта 20 мкл.

1.8.3. Выделение ДНК при помощи магнитных частиц

Ещё один метод выделения молекулы, он заключается в том, что в исследуемый образец добавляются магнитные шарики и специальное лизирующее средство. Шарики связывают выделившуюся ДНК, а в процессе очищения происходит вымывание оставшихся клеточных элементов. Завершающим шагом становится элюирование молекулы низко солевым буфером.

Вносят в пробирку на 1,5 мл подготовленный образец растительной ткани. Добавляют 500 мкл буфера PlantDNAPrep и частично гомогенизируют образец. Центрифугируют 5 мин при 8000 об/мин и удаляют супернатант. К осадку добавляют 250 мкл буфера PlantLysis и гомогенизируют образец. Центрифугируют 3 мин при 1216 тыс. об/мин. Отобирают 150 мкл супернатанта в чистую пробирку и добавляют к отобранному супернатанту 100 мкл хлороформа, встряхивают на вортексе и центрифугируют 3 мин. при 1216 тыс. об/мин. Далее переносят 100 мкл очищенного хлороформом супернатанта в чистую пробирку и добавляют 120 мкл буфера Start. При отборе супернатанта от хлороформа не задевать интерфазу между водной частью и хлороформом. Тщательно перемешивают раствор и оставляют инкубироваться при комнатной температуре 3 минуты. Подготовить пробирку со смесью 400 мкл буфера Binding и 20 мкл магнитных частиц DNA Grade. Тщательно размешать частицы в буфере. Смешать раствор, полученный после инкубации с буфером Start, с суспензией магнитных частиц в буфере Binding. Тщательно перемешать раствор пипетированием и оставить при комнатной температуре на 5 мин. Поместить пробирку в магнитный штатив, дать частицам время полностью собраться на стенке пробирки (может потребоваться вплоть до 1 минуты) и удалить супернатант. Перенести пробирку в немагнитный штатив. Внести в пробирку 150 мкл хорошо перемешанного буфера Wash 1, тщательно перемешать пипетированием. Поместить пробирку в магнитный штатив, дайте частицам время полностью собраться и удалить супернатант. Перенести пробирку в немагнитный штатив. Внести в пробирку 150 мкл хорошо перемешанного буфера Wash 2, тщательно перемешать пипетированием. Поместить пробирку в магнитный штатив, дать частицам время полностью собраться и удалить супернатант. Переместить пробирку в немагнитный штатив. Внести в пробирку 300 мкл буфера Wash 3, тщательно перемешать пипетированием. Поместить пробирку в магнитный штатив, дать частицам время полностью собраться и удалите

супернатант. Перенести пробирку в немагнитный штатив. Внесите в пробирку 300 мкл буфера FinalWash, тщательно перемешать пипетированием. Поместить пробирку в магнитный штатив, дать частицам время полностью собраться и удалить супернатант. Поместить пробирку с открытой крышкой в термостат и сушить при 60 °C в течение 10 минут.

1.8.4. Экстракция силикой

Используемый принцип выделения ДНК, основанна связывании ДНК и осаждении на мембране с силикой. Осажденная ДНК очищается двумя промывочными растворами, содержащими этанол и, затем элюируется специальным буфером, в котором потом может храниться довольно долго. Добавить 350 мкл лизирующего буфера А (LysisBuffer) в 1,5 мл чистую пробирку.

Перенести изначально обработанную (обработанную жидким азотом, либо свежую, либо высушенную и перетертую пестиком) ткань растения в пробирку. Вес ткани не должен превышать 100 мг. Добавить 50 мкл лизирующего буфера В (LysisBuffer В). Перемешать. Инкубировать образец в термостате при температуре 65°C минимум 10 минут. Добавить 130 мкл связывающего раствора PrecipitationSolution. Перемешать содержимое пробирки путем переворачивания. Инкубировать 5 минут на льду (можно просто поставить в холодильник). Центрифугировать 5 минут на максимальной скорости (14 000 rpm). Аккуратно, не захватывая остатков ткани, собрать супернатант и перенести в новую чистую пробирку. Добавить 400 мкл PlantgDNABindingSolution и 400 мкл чистого 96% этанола. Тщательно перемешать. Перенести раствор на колонку (можно половину, если весь объем не помещается). Центрифугировать 1 минуту при 8000 об/мин. Вылить жидкость. Добавить 500 мкл. WashBuffer I в колонку. Центрифугировать 1 минуту при 10000 об/мин. Вылить жидкость. Добавить 500 мкл. WashBuffer II в колонку. Центрифугировать 3 минуты при

максимальной скорости. Вылить жидкость. Перенести колонку в новую стерильную 1,5 мл пробирку, предварительно отрезав у нее крышку. Нанести на колонку 100 мкл ElutionBuffer. Наносить необходимо плавно, в самый центр колонки, чтобы жидкость равномерно распределилась по фильтру. Инкубировать 10 минут при комнатной температуре. Центрифугировать 5-10 минут при 10000 об/мин. Осадок будет содержать очищенную ДНК, готовую к постановке ПЦР или других реакций. Выделенную ДНК следует хранить при -20 °С.

1.8.5. Сорбционная экстракция ДНК. Солевая экстракция

Основной принцип солевой экстракции – осаждение липидов и белков на кристаллах ДДС – Na (додецилсульфата натрия). Кристаллы выпадают в условиях высокой силы ионной силы.

Материал обрабатывают лизирующим раствором. Растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора сорбируется на частичках сорбента. Другие компоненты (белки и липиды) осаждаются на кристаллах ДДС - Na (додецилсульфата натрия). При добавлении 6 MNaCl происходит переход ДНК в раствор, который отделяется центрифугированием. В результате указанной процедуры получается очищенный препарат ДНК.

Отбирают необходимое количество пробирок Эппендорф. Навеску растительного образца 50 – 100 мг помещают в пробирку. Добавляют в пробирку 400 мкл лизирующего раствора. Тщательно гомогенизируют материал в лизирующем буфере в течении 20 сек, используя стеклянную палочку. К полученному гомогенату добавляют 40 мкл 20% раствора ДДС – Na и 8 мкл раствора протоиназы К. Перемешивают на вортрексе 15 сек. Инкубируют в термостате при 65°C в течении 30 мин. По окончании инкубации в пробирку добавляют 30 мкл 6 MNaCl, перемешивают на вортрексе 15 сек и центрифугируют 20 мин при 15000 об/мин. Полученный супернатант переносят в чистую пробирку и для отмывки добавляют равное

количество этилового спирта 96%. Помещают в морозильную камеру (-18) на 15 мин. Далее инкубируют содержимое пробирок при 65°C в течении 30 мин и центрифугируют 20 мин при 10000 об/мин. Супернатант полностью удаляют. Осадок высушивают в открытых пробирках при 65°C в течении 5-7 мин. К высушенному осадку добавляют 500 мкл воды и оставляют растворяться с течением суток при температуре 70°C.

1.8.6. Спиртовое осаждение

Спиртовое осаждение — в основе методики лежит агрегация НК в присутствие соли и спирта.

После осаждения спиртом НК отделяется от раствора центрифугированием. Осадок, содержащий целевую НК, отмывается 70% этиловым спиртом с последующим центрифугированием. После удаления супернатанта осадок подсушивается и растворяется в водном буфере. Роль соли в протоколе экстракции состоит в том, что её положительно заряженные ионы нейтрализуют отрицательный заряд на сахаро - фосфатном скелете НК, приводя к снижению растворимости последних в воде и к выпадению НК в осадок.

При выделении малых количеств НК (менее 100 нг) для визуализации осадка и улучшения процесса преципитации рекомендуется использовать соосадители, такие как гликоген, линейный полиакриломид или декстран. В некоторых протоколах экстракции предлагается добавлять соосадители непосредственно к этанолу или изопропанолу. Соосадитель, таким образом, следует добавлять непосредственно в лизирующий буфер или к образцу. На предпоследнем этапе выделения ДНК проводится добавление 70% этанола для отмывки осадка от остатков солей. Важно, чтобы отмывка проводилась именно водным раствором спирта, так как соли хорошо растворяются в воде и в гораздо меньшей степени в спирте. Кроме того, использование 70% этанола препятствует переходу НК в водную фазу. На завершающем этапе

процедуры происходит растворение НК в водном буфере обычно при температуре 56-65°C и вортексировании.

Данная методика подходит как для молекулярно-генетических исследований, так и для диагностики инфекционных заболеваний.

1.8.7. Выделение ДНК. Экстракция материала с помощью комплекта «ДНК – сорб – С – М»

Комплект реагентов «ДНК-сорб-С-М» предназначен для экстракции ДНК из биологического материала от животных: тканевой (биопсийный (кожа и слизистые оболочки мочеполовой системы, ЖКТ, бронхов), операционный и аутопсийный) материал; и экстракции ДНК из продуктов питания, биологических добавок, кормов для животных или растительного сырья для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Исследуемый образец обрабатывается лизирующим раствором с протеиназой К, в результате чего происходит деструкция клеточных мембран, высвобождение НК и клеточных компонентов. Растворенные НК связываются с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного исследуемого материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и последующей отмывкой сорбента. При добавлении буфера для элюции к сорбенту происходит переход НК с поверхности силики в раствор, который отделяется от частиц сорбента центрифугированием. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат НК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

1.8.8. Выделение ДНК из клинического материала с помощью «АмлиПрам ДНК-сорб –АМ»

Для выделения ДНК используются наборы серии «ДНК-сорб» на основе метода ВООМ позволяют решать все основные задачи в области экстракции нуклеиновых кислот из различных типов клинического материала для последующих ПЦР-исследований: «ДНК-сорб-АМ» – экстракция ДНК из соскобов и мазков слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротовой полости, образцов мочи, секрета предстательной железы.

Исследуемый образец обрабатывают лизирующим раствором в присутствии сорбента. В результате происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК связывается с частицами сорбента, когда другие компоненты лизированного биологического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и его отмывке. При добавлении буфера для элюции к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности сорбента в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую чувствительность ПЦР- исследования.

Для данного метода необходимо подготовить необходимое количество пробирок. Внести в одноразовые пробирки по 10 мкл суспензию рекомбинантного фага с клонированным фрагментом неконкурентного ВКО со стандартизированной концентрацией. Ресуспендировать сорбент, перемешивая на вортексе. Внести в каждую пробирку по 20 мкл ресуспендированного сорбента, затем внести по 300 мкл лизирующего раствора. Затем внести в пробирки по 100 мкл исследуемых образцов, в пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести 100 мкл ОКО. Пробирки плотно закрыть, содержимое перемешать на вортексе и

инкубировать 5 мин при 65°C в термостате. Содержимое пробирок перемешивать на вортексе и оставить при комнатной температуре на 2 мин. Центрифугировать пробирки при 10 тыс. об/ мин в течение 30 сек. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость. Добавить в пробы по 1 мл отмывочного раствора, перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат с температурой 65°C на 5-10 мин для подсушивания сорбента, крышки пробирок должны быть открыты. В пробирки добавить по 100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК и перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой 65°C на 5 мин. Центрифугировать пробирки при 12 тыс. об/ мин в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

Пробы можно хранить в течение 1 недели при температуре от 2 до 8°C или в течение года при температуре не выше минус 16°C.

1.9. Электрофорез

Агарозный гель электрофорез занимает сейчас важное место среди методов исследования нуклеиновых кислот. Этот метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по параметрам, как размеры, пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд. Агароза – это чистая фракция природного линейного полисахарида агара, извлекают из некоторых морских водорослей. Гелеобразование идет путем связывания в пространственную сетку пучков нитей за счет водородных связей между ними. При температурах 84-96°C раствор агарозы переходит в прозрачную жидкость то есть «плавится».

Расплавленную в СВЧ-печи агарозу предварительно охлаждают до 50-55°C и уже при этой температуре дозируют и заливают в формы. Поры геля, при электрофорезе, должны быть легко проницаемы для молекул биополимеров, поэтому для электрофореза применяют агарозные гели с концентрацией от 0,4 до 2%. Приготовленный в такой концентрации гель

позволяет разделять и детектировать молекулы двуцепочечной ДНК от 300 п.н. до 20 000 п.н.

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР в агарозном геле проводили с использованием стандартных наборов на сертифицированном оборудовании.

Детекцию результатов проводили путем окрашивания агарозного геля бромистым этидием с последующей визуализацией при освещении УФ. Документирование результатов проводили с помощью программы «Biotest-D» (Биоком, Россия).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

В работе использованы зараженные грибами *Fusariumgraminerum* зерна пшеницы. Также использовали не зараженные зерна пшеницы. Материал был любезно предоставлен лабораторией научно-внедренческого предприятия «БашИнком».

Определение заспоренности методом смыва – обязательный анализ семенных партий для выявления головневой инфекции и последующего выбора протравителя. Заспоренность является важным показателем, оказывающим отрицательное воздействие на качество зернового сырья, используемого на кормовые и пищевые цели. Поэтому был произведен смыв с зараженного и не зараженного зерна пшеницы.

2.1. Выделение ДНК. Экстракция материала с помощью комплекта «ДНК – сорб – С – М»

Ход работы:

Прогрели буфер для лизирующего реагента и раствор для отмывки 1, если они хранились при температуре от 2 до 8°C, при температуре 64 °C до полного растворения кристаллов. Выставили в штатив пробирки объемом 1,5 мл с предварительно обработанными исследуемыми образцами. Подготовили одноразовую полипропиленовую пробирку объемом 1,5 мл с завинчивающейся или плотно закрывающейся крышкой для отрицательного контроля экстракции (ОК). В пробирку внесли 100 мкл ОК. Добавили в пробирки с исследуемыми образцами и ОК по 400 мкл буфера для лизирующего реагента и по 17 мкл лизирующего реагента. Плотно закрыли крышки, тщательно перемешали и осадили капли на вортексе. Поместили пробирки в термостат с температурой 64 °C на 1 ч, периодически перемешивая на вортексе (5 раз через каждые 10–12 мин). Осадили нерастворенные частицы образцов центрифугированием в течение 5 мин при

10 тыс об/мин. Отобрали необходимое количество новых одноразовых полипропиленовых пробирок объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками. Ресуспендировали сорбент универсальный, интенсивно перемешивая на вортексе. Добавили в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального, плотно закрыли крышки. Из пробирок с лизированными образцами отобрали надосадочную жидкость в объеме 200–350 мкл очень аккуратно (избегая попадания взвешенных частиц и капель жира) отдельными наконечниками с фильтрами и перенесли в пробирки с сорбентом. Перемешали на вортексе, оставили в штативе на 10 мин, перемешивая через каждые 2 мин. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 5 тыс. об/мин. Не захватывая сорбент, удалили надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Добавили в пробирки по 300 мкл раствора для отмывки 1, плотно закрыли крышки, перемешали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 2 тыс g. Не захватывая сорбент, удалили надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Добавили в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 2, плотно закрыли крышки, перемешали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 10 тыс об/мин. Не захватывая сорбент, удалили надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Повторили процедуру отмывки, следуя пп. 15-16, удалили надосадочную жидкость полностью. Поместили пробирки с открытыми крышками в термостат с температурой 64 °C на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. Добавили в пробирки по 50 мкл буфера для элюции. Перемешали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

Поместили в термостат с температурой 64 °С на 5–10 мин, периодически (1 раз в мин) перемешивая на вортексе. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 10 тыс.об/мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 мес и при температуре не выше минус 68°С в течение года. Для этого необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

2.2 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Аmplификацию участков ДНК осуществляли с использованием стандартных наборов на амплификаторе «Терцик МС-2».

Реакционная смесь объемом в 30 мкл содержала 2 мкл исследуемого образца ДНК, по 2 мкл каждого праймера, по 14 мкл H_2O и по 12 мкл дополнительных компонентов. Для предотвращения испарения смеси в процессе реакции в каждую пробирку добавили по одной капле минерального масла.

На ДНК-амплификаторе запустили необходимую программу со следующими параметрами:

- Начальная денатурация 94°С – 1 мин, 1 цикл.
- 40 циклов амплификации:
- денатурация 94°С – 30 сек,
- отжиг 51,3-58,6°С – 30 сек,
- элонгация 72° С – 30 сек.
- Достраивание цепей ДНК 72°С – 2 мин, 1 цикл.

После окончания ПЦР провели агарозный гель-электрофорез.

2.3 Электрофорез

Агарозный гель-электрофорез проводили по следующим этапам:

Приготовили 1л 1х-ного ТБЕ буфера путем разбавления 50х-ного ТБЕ буфера в дистилированной воде. К 20мл 50х-ного ТБЕ буфера добавили 980 мл дистилированной воде. Тщательно перемешали. Взвесили 1,7 агарозы и добавили 100 мл 1х-ного ТБЕ буфера, перемешали и расплавили смесь в СВЧ-печи в течении 2-3 минут. Смесь в колбе стала прозрачного цвета. Разлили агарозу на ровной поверхности в специальную форму (заливка) с одной пластиковой гребенкой, при этом толщина геля была 1 – 5 мм. Застыл гель за 20 минут. Налили в камеру для электрофореза необходимое количество 1х-ного ТБЕ буфера, поместили в него застывший гель. Буфер полностью покрывал гель. На специальных плашках перемешали 3-5 мкл смеси красителей (бромфеноловый синий, 30% глицерин, ксиленцианол) с 5-10 мкл выделенных образцов ДНК. Нанесли автоматической пипеткой пробу ДНК с красителем в лунку геля в последовательности, соответствующей нумерации проб. Раствор ДНК не всплывал из лунки благодаря глицерину. Подключили клеммы прибора к источнику питания так, чтобы (-) находился на старте, а (+) – на финише. При помощи источника питания (Эльф-4, ДНК-Технология) запустили электрофорез при следующих параметрах: сила тока 400 мА, мощность 80Вт, напряжение 120 В. Пузырей было больше на старте, чем на финише. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляли визуально по движению полосы красителя. Проводили электрофорез в течении 20-60 минут, затем вынули гель из формы и поместили в кювету для окрашивания. В кювету налили раствор бромистого этидия. Окрашивали в течении 10-20 минут. Краситель слили в колбу. Гель промыли проточной водой. Поместили его на стекло УФ-трансиллюминатора. Включили трансиллюминатор и проанализировали результаты анализа. Фрагменты анализируемой ДНК проявлялись в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основная проблема на этапе выделения ДНК из грибов заключается в трудности разрушения их клеточной стенки, которая существенно отличается от клеточной стенки бактерий и содержит глюканы, хитин, белки, обуславливающие устойчивость к действию большинства лизирующих агентов. Для лизиса клеточной стенки и более полного экстрагирования ДНК из клеток гриба использовали литические препараты, разрушающие компоненты клеточной стенки микромицетов. Поэтому для расщепления клеточной стенки микромицетов использовали коммерческий препарат «*Lysing Enzymes from Trichoderma harzianum*», обладающий целлюлазной, протеазной и хитиназной активностью и коммерческий препарат хитиназы «*Chitinase from Trichoderma viride*» в различных концентрациях и интервалах времени воздействия. Концентрацию полученного раствора ДНК определяли с помощью спектрофотометра «GeneQuant» («Amersham», США) использованием компьютерных программ Gene Runner 3.0 и Oligo 6.71.

Одной из нерешенных задач молекулярной диагностической детекции возбудителей микозов является низкая эффективность методов выделения высококачественной ДНК, что обусловлено наличием хитина в клеточных стенках микромицетов. Учитывая, что эффективность ПЦР во многом определяется качеством и количеством выделенной ДНК, провели сравнительную оценку эффективности нескольких способов её выделения с целью определения оптимального метода для работы с клиническими образцами, в которых содержание грибов варьирует в широких пределах и, как правило, присутствуют криптоические ингибиторы амплификации. Для этого использовали следующие методы: солевая экстракция, фенольно-хлороформная экстракция, нуклеосорбция. Вне зависимости от сравниваемых методов на стадии гомогенизации ткани для повышения глубины лизиса в экстракт клинического образца дополнительно вносили 15 мкл хитиназы. В результате проведенных исследований установили, что при

использовании метода фенольно-хлороформной экстракции без хитиназы ДНК из клинических образцов выделялась в минимальных количествах, выход ДНК при использовании данного метода несколько увеличивался при добавлении хитиназы. Метод солевой экстракции ДНК в сравнении с фенольно-хлороформной был более эффективным, при этом выход ДНК также повышался при использовании хитиназы. Наибольший выход ДНК изучаемых патогенных дерматомицетов получили методом нуклеосорбции с предварительной обработкой проб хитиназой (рисунок 1). Таким образом, в дальнейшей работе решено использовать именно эту методику при выделении ДНК.

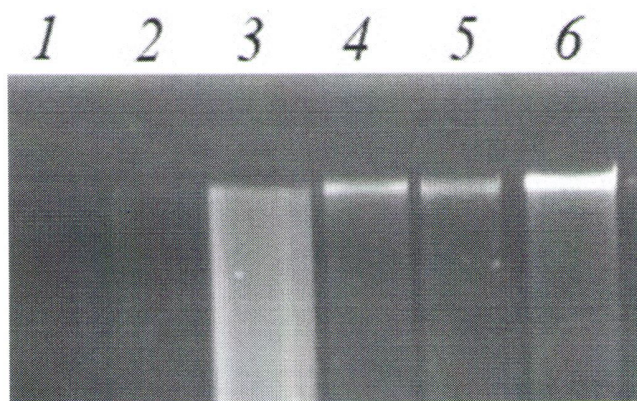


Рисунок 1 – Электрофореграмма результатов выделения тотальной ДНК различными методами. 1 – метод фенольно-хлороформной экстракции, 2 – метод фенольно-хлороформной экстракции с добавлением хитиназы, 3 – метод солевой экстракции, 4 – метод солевой экстракции с добавлением хитиназы, 5 – метод нуклеосорбции, 6 – метод нуклеосорбции (коммерческий набор «ДНК-сорб-С-М»)

Далее измерили концентрацию ДНК в полученных различных методами образцах. Концентрацию полученного раствора ДНК определяли с помощью спектрофотометра «GeneQuant» («Amersham», США) использованием компьютерных программ Gene Runner 3.0 и Oligo 6.71. В результате анализа установлено, что наименьшая концентрация ДНК характерна для образцов, выделенных методом фенольно-хлороформной экстракции. Однако, при использовании хитиназы концентрация ДНК увеличилась в два раза, но осталась на низком уровне. Наибольшая

концентрация ДНК характерна для образцов ДНК, выделенных методом нуклеосорбции, при этом добавление хитиназы также способствовало увеличению концентрации ДНК в образце.

На основании проведенных экспериментов установлено, что применение лизирующих ферментов из *T.harzianum* в оптимальной концентрации 2 мг/мл с инкубированием смеси 1 ч при температуре 37 ($\pm$ 1) °С позволило повысить эффективность экстракции ДНК из клеток *F. graminearum*. В этом случае концентрация ДНК составила 4,3 пкг/мкл. Аналогичные показатели были получены при предварительном воздействии фермента хитиназы в концентрации 0,2 мг/мл с инкубированием смеси 1 ч при температуре 37 ($\pm$) °С (рисунок 2). После подбора метода выделения и оптимальных концентраций литических ферментов в реакции ПЦР были исследованы все штаммы *F. graminearum*. В результате полученных данных были выявлены различия показателей аналитической чувствительности сконструированных праймеров. Наибольшей чувствительностью обладали праймеры HcMs8s-Ms8as3. Продукт амплификации синтезировался со всеми исследуемыми штаммами гриба с чувствительностью реакции 1×10^2 - 1×10^4 кл/мл в зависимости от штамма. С праймерами на основе фрагмента гена *cbp1* в концентрации $1 \times$ кл/мл в реакции ПЦР ДНК *F. graminearum* детектировали в 78% случаев, а ДНК *F. graminearum* в этих же концентрациях в 100%.

У праймеров HcMs8s2-Ms8as чувствительность была ниже, чем у других взятых в работу праймеров - при концентрации 1×10^4 кл/мл детектировались 58 % проб. При этом, праймеры не детектировали ДНК *F. graminearum*, что позволяет с помощью ПЦР дифференцировать между собой клинически значимые варианты. Для сравнения информативности результатов ПЦР с разработанными нами праймерами использовали затравки, комплементарные последовательностям гена 18S рРНК (GenBank NCBI X58572) и гена, кодирующего структуру специфического белка

F. graminearum, имеющего молекулярную массу 100 кДа (GenBank NCBI AJ005963).

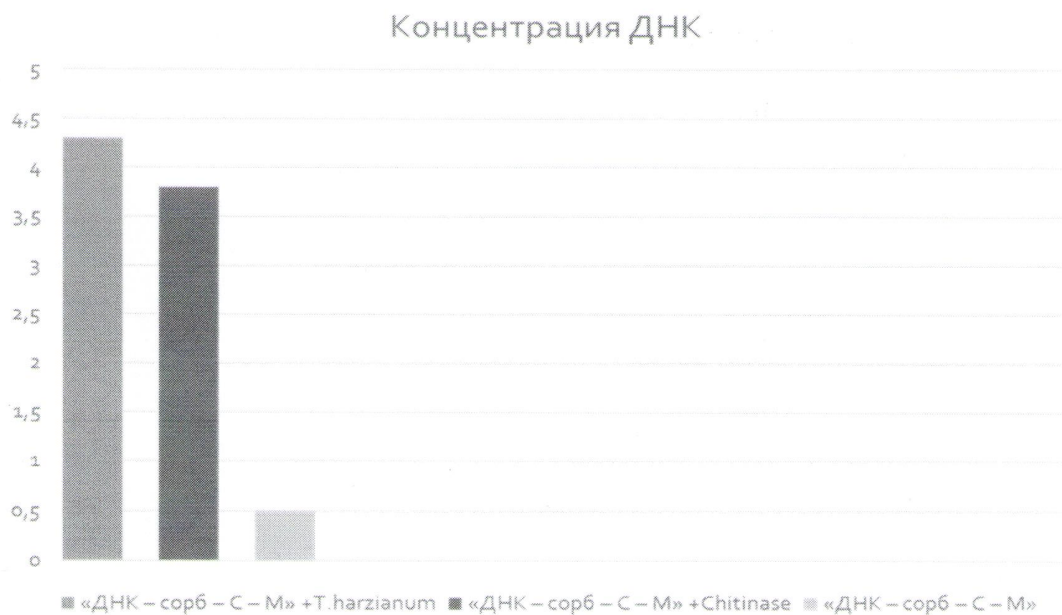


Рисунок 2 – Концентрация ДНК *F. graminearum* при различных модификациях использования коммерческого набора «ДНК-сорб-С-М» методах выделения.

1 – коммерческий набор «ДНК-сорб-С-М» метод, 2 – коммерческий набор «ДНК-сорб-С-М» с добавлением коммерческого препарата «*Lysing Enzymes from Trichoderma harzianum*», 3 – коммерческий набор «ДНК-сорб-С-М» Chitinase from *Trichoderma viride*» с добавлением коммерческого препарата

Реакцию амплификации с праймерами Hc100 PCR, детектирующими ген, кодирующий 100 кДа белок, и с праймерами Fungus, детектирующими ген 18S рРНК, проводили согласно протоколам, представленным зарубежными авторами

С помощью олигонуклеотидных затравок на основе гена, кодирующего 100 кДа белок *F. graminearum* (Hc100 PCR), в ПЦР синтезировались ампликоны всех трех вариантов *F. graminearum* с чувствительностью 1×10^4 кл/мл.

Перекрестных реакций с используемыми в работе микромицетами не обнаружено. Однако, реакция амплификации с праймерами Hc100 PCR

проводится в два раунда, что в свою очередь увеличивает риск контаминации, временные и материальные затраты на получение результатов ПЦР.

На основании сравнения результатов аналитической чувствительности разработанных праймеров в дальнейшей работе с пробами окружающей среды и биологического материала использовали праймеры HcMs8s-Ms8as3.

При исследовании проб окружающей среды (почва, вода), искусственно контаминированных клетками *H.capsulatum*, наибольшей чувствительности реакции амплификации удалось достигнуть, используя тот же метод, что и при работе с чистыми культурами. Чувствительность реакции ПЦР составила 1×10^4 кл/мл.

Так же были апробированы различные методы выделения ДНК из проб биологического материала, искусственно контаминированного клетками *H.capsulatum*. При сравнении используемых в работе методов более эффективным оказался метод гуанидин-фенол-хлороформной депротеинизации с последующей очисткой нуклеосорбцией на SiO_2 . Метод обеспечивал визуализацию результатов реакции амплификации при концентрации микромицетов в пробе не ниже 1×10 кл/мл.

Для повышения чувствительности ПЦР при выделении ДНК из проб крови мы дополнительно использовали буфер, лизирующий эритроциты, следующего состава: 10 мМ Трис, pH 7,6; 5 мМ MgCl_2 ; 10 мМ NaCl. В ходе работы было установлено, что предварительная обработка проб лизирующим буфером и воздействие фермента хитиназы повышает чувствительность ПЦР до 1×10^3 - 1×10 кл/мл.

В процессе выделения ДНК из биологического материала основная задача – хорошо диспергировать ткань, чтобы разрушить клетки, а затем отделить ДНК от сопутствующих ей белков и посторонних примесей для постановки ПЦР. Так как в макроорганизме *F. graminearum* располагается преимущественно внутриклеточно, в случае выделения ДНК из биологического материала, к исследуемому образцу, для лизиса тканей

органа добавляли 50 мМ NaOH. Установлено, что щелочной лизис и ферментативное воздействие хитиназы при выделении ДНК *F. graminearum* из биологического материала позволяет повысить чувствительность ПЦР до 1×10^4 клеток в пробе.

Диагностическая информативность ПЦР с праймерами HcMs8s-Ms8as была изучена при работе с материалом, полученным от лабораторных животных, экспериментально зараженных возбудителем фузариоза в различные сроки инфекционного процесса. Параллельно анализируемые пробы исследовали микологическим методом. Использование праймеров HcMs8s-Ms8as3 при анализе органов животных методом ПЦР позволило выявить исследуемые микроорганизмы в 19 (14,8 %) из 128 проб.

Применение культурального метода позволило обнаружить возбудителя в 21,1 % (т.е. в 27 из 128 проб).

В реакции амплификации ДНК возбудителя фузариоза детектировали во всех исследуемых образцах. Процент положительных проб варьировал от сроков наблюдения и исследуемых тканей.

Возможность получения результатов ПЦР в более ранние сроки является одним из главных преимуществ метода и помогает в решении основной проблемы микологического метода - длительности (до 3 недель) исследования. Полученные результаты могут служить основанием для рекомендации использования разработанных праймеров, комплементарных фрагменту гена ms8, при исследовании проб биологического материала на наличие возбудителя фузариоза.

Используя подобранные нами ранее олигонуклеотидные праймеры HcMs8s-Ms8as3 на основе нуклеотидной последовательности гена ms8, разработана тест-система для выявления ДНК возбудителя фузариоза методом полимеразой цепной реакции в пробах чистых культур и биологического материала.

С целью определения диагностической ценности (специфической активности, специфичности) набора реагентов для выявления ДНК

микромицетов вида *F. graminearum* методом полимеразной цепной реакции была разработана программа и проведено контрольное лабораторное испытание препарата. Материалом для исследования служили чистые культуры возбудителей фузариоза и искусственно контаминированная кровь.

Специфическую активность препарата определяли анализом лизатов десятикратных разведений суспензии агаровых культур *F. graminearum*. За специфическую активность принимали минимальную концентрацию микробных клеток, находящихся в 1 мл исследуемой пробы. Было установлено, что нижний предел чувствительности тест-системы в реакции амплификации, при исследовании проб содержащих *F. graminearum*, составил 1×10^2 кл/мл (45% случаев). При наличии в пробе *F. graminearum* в концентрации 1×10^3 кл/мл процент положительных результатов реакции амплификации увеличился с 45 до 75%. В 100% случаев ДНК возбудителя гистоплазмоза определяли при концентрации микромицета 1×10^4 и выше кл/мл. При исследовании проб биологического материала методом ПЦР детектирует ДНК возбудителя гистоплазмоза в концентрациях 1×10^4 кл/мл. Ложноположительных результатов ПЦР при исследовании проб не содержащих ДНК возбудителя фузариоза не зафиксировано.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать заключение об эффективности ПЦР-анализа в выявлении ДНК возбудителя гистоплазмоза. набор реагентов для выявления ДНК микромицетов вида *F. graminearum* методом полимеразной цепной реакции, предназначенный для идентификации *F. graminearum*, удовлетворяет всем предъявляемым к современным диагностическим системам требованиям по специфической активности и специфичности, а следовательно, может эффективно применяться для идентификации ДНК *F. graminearum*.

Выявлено, что группоспецифические праймеры HcMs8s-Ms8as3, комплементарные фрагменту гена, кодирующего белок мицелиальной фазы Ms8 и праймеры HcCBP1s-HcCBP2as – на основе гена кальцийсвязывающего белка CBP, позволяют детектировать *F. graminearum*.

Показано, что с помощью праймеров HcMs8s-Ms8as3, HcCBP1sHcCBP2as и HcMs8s2-Ms8as, возможна дифференциация клинически значимых вариантов возбудителя фузариоза - *F. graminearum*.

На основе нуклеотидной последовательности гена, детерминирующего белок мицелиальной фазы Ms8 определены олигонуклеотидные затравки, подобраны оптимальные условия, определены параметры проведения ПЦР и сконструирована амплификационная тест-система для идентификации возбудителя гистооплазмоза, позволяющая выявлять *F. graminearum* в концентрации 1×10 кл/мл.

Продемонстрирована возможность применения амплификационной тест-системы, разработанной на основе олигонуклеотидных затравок HcMs8s-Ms8as3 для специфической детекции *F. graminearum* при исследовании объектов внешней среды (почвы, воды), искусственно контаминированных возбудителем гистооплазмоза и моделировании инфекционного процесса.

Подобраны оптимальные способы экстракции и очистки ДНК возбудителя фузариоза из контаминированных проб различных объектов внешней среды и биологического материала, позволяющие выявлять ДНК возбудителей фузариоза с чувствительностью 1×10^4 кл/мл.

Установлено, что использование литических ферментов «Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum*» или «Chitinase from *Trichoderma viride*» на стадии пробоподготовки повышает концентрацию и чистоту препарата выделяемой ДНК, и, как следствие, чувствительность реакции амплификации на один-два порядка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных экспериментов установлено, что применение лизирующих ферментов из *T.harzianum* в оптимальной концентрации 2 мг/мл с инкубированием смеси 1 ч при температуре 37 ($\pm$ 1) °С позволило повысить эффективность экстракции ДНК из клеток *F. graminearum*. В этом случае концентрация ДНК составила 4,3 пкг/мкл. Аналогичные показатели были получены при предварительном воздействии фермента хитиназы в концентрации 0,2 мг/мл с инкубированием смеси 1 ч при температуре 37 ($\pm$) °С.

Таким образом, в результате проведенных исследований предложен способ выделения ДНК возбудителя фузариоза, позволяющий проводить эффективный лизис клеток и очистку ДНК патогенных грибов, обеспечивающий высокую чувствительность и специфичность реакции амплификации.

ВЫВОДЫ

1. Выделения ДНК из грибов затруднено строением их клеточной стенки, которая содержит глюканы, хитин, белки, обуславливающие устойчивость к действию большинства лизирующих агентов;

2. Применение литических препаратов, разрушающих компоненты клеточной стенки микроицетов позволит достичь более полного экстрагирования ДНК из клеток гриба.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова, С. Л. Диагностика фитопатогенных грибов *Septoriatritici* и *Stagonosporanodorum* методом FLASH-ПЦР / С. Л. Абрамова, Д. Ю. Рязанцев, Т. М. Воинова, С. К. Завриев // Биоорганическая химия. - 2008. - Т. 34. - No. 1. - С. 107–113.
2. Архангельский В. И., Мельниченко П.И. Гигиена. Compendium. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 392 с.
3. Воронин Н.С. О "пьяном" хлебе в Южно-Уссурийском крае // Ботанический сад - С-Пб. - 1890–1892. - Вып. 3. - С. 13–21.
4. Г.В. Волкова, Новинка для контроля фузариоза колоса зерновых // Земля и жизнь. – 2013. – 30 апреля.
5. Гагкаева Т.Ю. Эколого-популяционные исследования гриба *Fusarium culmorum* и фузариозоустойчивость пшениц и эгилопсов. Автореф. канд. дисс. – СПб, 1994, 22 с.
6. Гагкаева, А.Ю. Фузариоз зерновых культур / Т // Приложение к журналу "Защита и карантин растений". 2011. № 5. С. 70—119.
7. Гришина М.А., Кочубеева Е.Н., Лигашцкий А.В., Вьючнова Н.В., Ткаченко Г.А., Савченко С.С., Антонов В.А. Разработка препаратов для диагностики особо опасных микозов / Инфекция и иммунитет // Материалы X съезда ВНПОЭМП, Москва, 12-13 апреля, 2012, Т.2.-№1-2.-С.254.
8. Зверева, В.В., Бойченко М.Н. Основы микробиологии и иммунологии - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 368с.
9. Иващенко В.Г., Сотченко Е.Ф., Сотченко Ю.В. Совершенствование системы оценок кукурузы на устойчивость к засухе и фузариозу початков // Вестник защиты растений, 2006, № 1, с. 16–20.
10. Рязанцев, Д. Ю. Диагностика токсигенных грибов рода *Fusarium* методом FLASH-ПЦР / Д. Ю. Рязанцев, С. Л. Абрамова, С. В. Евстратова, Т. Ю. Гагкаева, С. К. Завриев // Биоорганическая химия. - 2008. - Т. 34. - No. 6. - С. 799–807.

11. Стахеев, АА. Разработка специфических маркеров для изучения генетического полиморфизма токсигенных грибов рода *Fusarium*: Дис. – Москва, 2013, - 139с.
12. Ули-Маттила Т. Молекулярная идентификация хемотипов *Fusarium gramineum*// Защита растений. - 2007. - №5. - С. 60—67.
13. Шанхозова В.Ю., Феоктистова А.С., Чижевская Е. Л. и др. Особенности колонизации ячменя почвообитающим грибом *Fusarium culmorum*. Микология и фитопатология – М.: Наука, 2012. – 215с.
14. Шипилова Н.П. Видовой состав и биоэкологические особенности возбудителей фузариоза семян зерновых культур: Автореф.дис.канд. биол. наук: 06.01.11/ Санкт – Петербург. –М., 1994. - 20с.
15. Bechtel D.B., Kalieikau L.A., Gaines R.L., Sietz L.M. The effect of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernels // *Cer. Chem.*, 1985, № 62, p. 191–197.
16. Bushell W.M.R., Hazen B.E., Pritsch C. Histology and physiology of *Fusarium* head blight / In book: *Fusarium head blight of wheat and barley*. – APS PRESS. 2003.с.44 – 83.
17. Danks C., Barker I. (2000). On-site detection of plant pathogens using lateral-flow devices. *Bull. OEPP*. 30, 421–426.
18. Headrick J.M., Pataky J.K. Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme* // *J. of Veterinary Diagnosis and Investigation*, 1991, № 2, p. 217–221.
19. Kellerer T. (2006). Development of immunochemical and PCR methods for qualitative detection of *Tilletia* species in organic seeds. *Czech. J. Genet. Plant. Breed.* с.42 - 74.
20. Schwarz P.B. Impact of *Fusarium* head blight on malting and brewing quality of barley / In book: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. – APS PRESS, 2003, p. 395–41

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Выпускная квалификационная работа выполнена мной самостоятельно. Используемые в работе материалы из опубликованной научной литературы и других источников имеют ссылки на них. Проверка в системе «Антиплагиат» выполнена.

Уровень оригинальности работы составляет 70 %.

Работа изложена на 45 страницах машинописного текста, содержит __ таблиц, 2 рисунков. Библиографический список включает 20 источников, из них 14 отечественных и 6 иностранных авторов.

подп. Терещенкина Кристина Олеговна

«28» июня 2017 г.

УВАЖАЕМЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ!

Обращаем ваше внимание, что система «Антиплагиат» отвечает на вопрос, является ли тот или иной фрагмент текста заимствованным или нет. Ответ на вопрос, является ли заимствованный фрагмент именно плагиатом, а не законной цитатой, система оставляет на ваше усмотрение. Данный отчет не подлежит использованию в коммерческих целях.

Отчет о проверке на заимствования №1

Дата выгрузки: 28.06.2017 12:39:53

Автор: Кобзева Наталья Рудольфовна nrkob@mail.ru / ID: 5

Проверяющий: Кобзева Наталья Рудольфовна (nrkob@mail.ru / ID: 5)

Организация: Башкирский государственный медицинский университет

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://bashgmu.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 1925

Имя исходного файла: Диплом на антиплагиат

Размер текста: 792 кБ

Тип документа: Дипломная работа

Символов в тексте: 79735

Слов в тексте: 9147

Число предложений: 677

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Отчет от 28.06.2017 12:40:02 - Последний готовый отчет (ред.)

Комментарии: не указано

Модули поиска:

ЗАИМСТВОВАНИЯ

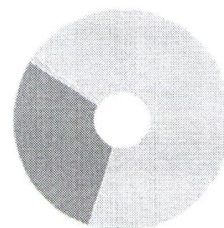
29.46%

ЦИТИРОВАНИЯ

0.09%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

70.45%



№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте
[01]	7.12%	8.21%	213437	http://e.lanbook.com	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Лань"	46	57
[02]	2.91%	3.3%	Бондаренко, Карина Рустамовна диссе..	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	27	33
[03]	1.86%	2.08%	ПУБЛИКАЦИИ ПО ПРОБЛЕМАМ КЛИН...	http://cyberleninka.ru	09 Окт 2015	Модуль поиска Интернет	12	14
[04]	1.56%	1.97%	не указано	http://iterramedica.spb.ru	02 Апр 2015	Модуль поиска Интернет	18	22
[05]	1.05%	1.94%	web-local.rudn.ru/web-local/prep/rj/files...	http://web-local.rudn.ru	01 Дек 2014	Модуль поиска Интернет	8	17
[06]	1.4%	1.82%	ref_Nemchenko.rar (3/6)	http://nzmedek.ru	30 Янв 2015	Модуль поиска Интернет	9	13
[07]	0.49%	1.8%	272379	http://biblioclub.ru	20 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	3	14
[08]	0.58%	1.61%	не указано	http://mma.ru	07 Мая 2009	Модуль поиска Интернет	7	18
[09]	0%	1.57%	Гинекология	http://ibooks.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"	0	14
[10]	0%	1.39%	Душкина ЕА	не указано	02 Мая 2014	Кольцо вузов	0	12
[11]	0%	1.39%	ДушкинаЕА2	не указано	23 Июнь 2014	Кольцо вузов	0	12
[12]	0%	1.38%	Гинекология. Учебник	http://biblioregion.com	26 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"	0	11
[13]	0.32%	1.37%	Наумкина, Елена Витальевна диссерт...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	3	8
[14]	0.44%	1.35%	Вестник РГМУ № 2, 2014	http://rgmu.ru	16 Дек 2016	Модуль поиска Интернет	6	14
[15]	0.16%	1.27%	Михайлюкова, Венера Анатольевна ди...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	1	9
[16]	0%	1.26%	Шибина, Лариса Викторовна диссерт...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	0	15
[17]	0.09%	1.24%	Горбачевич Ангелина Александровна ...	не указано	18 Мая 2017	Кольцо вузов	2	13
[18]	0%	1.24%	ДИПЛОМ___	не указано	23 Мая 2017	Кольцо вузов	0	13
[19]	0%	1.24%	ДИПЛОМ___	не указано	22 Мая 2017	Кольцо вузов	0	13
[20]	0%	1.24%	ДИПЛОМ___	не указано	24 Мая 2017	Кольцо вузов	0	13
[21]	1.05%	1.2%	http://www.volgmed.ru/uploads/files/20...	http://volgmed.ru	20 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет	3	6
[22]	0%	1.18%	Гейно Ксения Евгеньевна Diplom_Geyn...	не указано	04 Июнь 2017	Кольцо вузов	0	11
[23]	0%	1.18%	Неверовская Анастасия Валерьевна ЛИ.	не указано	22 Мая 2017	Кольцо вузов	0	11
[24]	0.45%	1.12%	Горина Арина курсовая Арина 4 курс _...	не указано	05 Мая 2017	Кольцо вузов	4	11

[25]	0.5%	1.11%	Принципы ПЦР-диагностики. Реферат...	http://bibliofond.ru	14 Июн 2014	Модуль поиска Интернет	2	5
[26]	0.15%	1.06%	Ворошилина, Екатерина Сергеевна ди...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	3	14
[27]	0%	1%	Крижановская Екатерина Олеговна ди...	не указано	21 Мая 2017	Кольцо вузов	0	11
[28]	0%	1%	диплом Валериана	не указано	23 Мая 2017	Кольцо вузов	0	11
[29]	0.44%	0.99%	ref_ivanova_EL_part1.rar (3/5)	http://nzmmedek.ru	30 Янв 2015	Модуль поиска Интернет	2	7
[30]	0%	0.93%	65440	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	11
[31]	0.02%	0.93%	Насыр Вероника Насыр В. 4 курс 05.05...	не указано	05 Мая 2017	Кольцо вузов	1	15
[32]	0.37%	0.92%	Лободанов, Сергей Александрович дис...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	3	6
[33]	0.18%	0.89%	Полимеразная цепная реакция	http://knowledge.allbest.ru	раньше 2011	Модуль поиска Интернет	1	6
[34]	0.56%	0.87%	Фархутдинова, Алсу Мансафовна диссе...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	7	11
[35]	0.87%	0.87%	Федеральное государственное учрежд...	http://netess.ru	28 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет	5	5
[36]	0.07%	0.84%	Вершинина, Зия Рифовна диссертаци...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	1	6
[37]	0.77%	0.84%	«СИГНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ	http://bg.anrb.ru	24 Дек 2014	Модуль поиска Интернет	2	3
[38]	0.69%	0.81%	infekciavkusherstve2007.doc	http://bookshare.net	30 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет	5	7
[39]	0.74%	0.74%	Вестник Башкирского государственно...	http://e.lanbook.com	21 Сен 2016	Модуль поиска Интернет	6	6
[40]	0%	0.72%	Семенов Денис Дмитриевич Курсовой...	не указано	01 Мая 2017	Кольцо вузов	0	10
[41]	0.1%	0.71%	109927	http://biblioclub.ru	14 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	2	9
[42]	0%	0.68%	216405	http://biblioclub.ru	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	0	4
[43]	0.14%	0.68%	ПЦР в реальном времени — 6-е изд. (эл...	http://books.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"	1	4
[44]	0.44%	0.68%	Марзанова, Саида Нурбиевна диссерт...	http://dlib.rsl.ru	07 Мар 2013	Коллекция диссертаций РГБ	2	4
[45]	0%	0.67%	Муллагалина, Аида Зиннуровна диссер...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	0	7
[46]	0%	0.67%	ПЦР в реальном времени	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"	0	5
[47]	0.28%	0.66%	Полный текст диссертации	http://ssnu.ru	11 Дек 2016	Модуль поиска Интернет	4	13
[48]	0.5%	0.62%	Кузовкина, Оксана Зульфаровна диссе...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	4	6
[49]	0%	0.62%	42449	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	3
[50]	0.6%	0.6%	Counters (7/9)	http://docme.ru	11 Фев 2016	Модуль поиска Интернет	5	5
[51]	0.41%	0.58%	Тихонова, Дина Валерьевна диссертаци...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	2	5
[52]	0.11%	0.57%	Шемшук, Марина Ивановна диссертаци...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	1	6
[53]	0.23%	0.47%	(pdf номера)	http://jowd.ru	20 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет	3	4
[54]	0.19%	0.45%	104244	http://biblioclub.ru	13 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	1	5
[55]	0%	0.43%	64323	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	5
[56]	0%	0.42%	272380	http://biblioclub.ru	20 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	0	2
[57]	0%	0.38%	60078	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	4
[58]	0.08%	0.37%	Методика проведения исследования к...	http://kk.convdocs.org	раньше 2011	Модуль поиска Интернет	2	6
[59]	0.09%	0.35%	115514	http://biblioclub.ru	14 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	2	6
[60]	0%	0.35%	Безопасность продовольственного сы...	http://biblioclub.ru	20 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	0	2
[61]	0.17%	0.34%	Муравьева, Вера Васильевна диссерт...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	1	4
[62]	0%	0.32%	Припутневич2	не указано	28 Ноя 2014	Кольцо вузов	0	3
[63]	0%	0.32%	ПрипутневичТВ	не указано	20 Июн 2014	Кольцо вузов	0	3

[64]	0.05%	0.31%	276048	http://biblioclub.ru	20 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	1	6
[65]	0%	0.29%	БайрамоваГР	не указано	27 Мар 2013	Кольцо вузов	0	3
[66]	0%	0.29%	Байрамова2	не указано	04 Апр 2013	Кольцо вузов	0	3
[67]	0.1%	0.28%	Зубкова, Оксана Сергеевна диссертаци.	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	1	3
[68]	0.25%	0.27%	Вахания, Кетеван Павловна диссертаци.	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	2	3
[69]	0.27%	0.27%	Шуникова, Марина Леонтьевна диссер.	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	2	2
[70]	0%	0.26%	115485	http://biblioclub.ru	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	0	4
[71]	0.1%	0.22%	Менухова, Юлия Николаевна диссертаци.	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	2	4
[72]	0.05%	0.2%	Гайсина, Юлия Рамилевна диссертаци...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	1	4
[73]	0.15%	0.18%	Плахова, Ксения Ильинична диссертаци.	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	2	3
[74]	0%	0.18%	276033	http://biblioclub.ru	20 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	0	4
[75]	0%	0.18%	60118	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	2
[76]	0.18%	0.18%	Скачать	http://monilag.ru	18 Дек 2016	Модуль поиска Интернет	2	2
[77]	0.14%	0.14%	45637	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	1	1
[78]	0.09%	0.12%	не указано	не указано	раньше 2011	Цитирование	2	3
[79]	0%	0.1%	http://www.medpressa.kuzdrav.ru/files/...	http://medpressa.kuzdrav.ru	28 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет	0	1
[80]	0%	0.1%	АсланянКО10	не указано	11 Фев 2016	Кольцо вузов	0	1
[81]	0%	0.1%	Асланян10	не указано	21 Окт 2015	Кольцо вузов	0	1
[82]	0%	0.09%	Социально-психологические и духовн...	http://bibliorossica.com	25 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"	0	1
[83]	0%	0.08%	BabayanAA_diss.docx	не указано	16 Ноя 2016	Кольцо вузов	0	1
[84]	0%	0.08%	Вестник новых медицинских технолог...	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"	0	1

28.06.2017

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

ОТЗЫВ

научного руководителя на выпускную квалификационную (дипломную) работу студента 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология» медико-профилактического факультета с отделением микробиологии

Перышкиной Кристины Олеговны

на тему «Оптимизация аналитических характеристик методологии ПЦР детекции грибов *Fusarium graminearum*».

Дипломная работа Перышкиной Кристины Олеговны посвящена вопросам оптимизации способов пробоподготовки для ПЦР-детекции грибов *Fusarium graminearum*, что может использоваться для контроля за заражённостью зерна при его хранении.

В процессе работы Перышкина К.О. проработала значительный объем литературных данных по биологии и физиологии грибов *Fusarium graminearum*, имеет представление о методах, используемых для выделения ДНК из грибов. Провела сравнительный анализ их преимуществ и ограничений.

За время выполнения дипломной работы Перышкина К.О. приобрела опыт работы с литературой, планирования и проведения исследований, освоила методы пробоподготовки при работе с растительными образцами и культурами грибов.

Дипломная работа Перышкиной К.О. завершена, в целом соответствует предъявляемым требованиям и может быть допущена к защите.

Научный руководитель:
зав. кафедрой ФПМ,
д.м.н., профессор



А.Р. Мавзютов

Научный консультант:
ст.преподаватель кафедры ФПМ,
к.б.н.



Т.Н.Титова

Дата: « » 22.06 2017 г.

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную (дипломную) работу студента 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология» (профиль микробиология)

медико-профилактического факультета с отделением микробиологии

ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

Перышкиной Кристины Олеговны

на тему «Оптимизация аналитических характеристик методологии ПЦР

детекции грибов *Fusarium graminearum*».

Работа построена по традиционной схеме, включает такие разделы как введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследования, представление данных и их обсуждения, заключение, выводы, список цитируемой литературы, приложения.

Во введении четко сформулированы цель и задача исследования, ясно показаны актуальность и значимость результатов исследования. Литературный обзор достаточно широко освещает состояние изучаемой проблемы. В главах, посвященных результатам исследования, подробно изложены основные итоги проведенной работы.

Дипломная работа Перышкиной К.О. удовлетворяет требованиям, предъявляемым к дипломным работам, может быть допущена к защите и заслуживает положительной оценки.

Рецензент:

профессор кафедры ФПМ

ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,

профессор, доктор биологических наук

Т.В.Маркушева

«22» 06 2017 г.

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную (дипломную) работу студента 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология» (профиль микробиология) медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
Перышкиной Кристины Олеговны
на тему «Оптимизация аналитических характеристик методологии ПЦР детекции грибов *Fusarium graminearum*».

На рецензию представлена дипломная работа на тему: «Оптимизация аналитических характеристик методологии ПЦР детекции грибов *Fusarium graminearum*».

Работа построена по традиционной схеме и включает следующие разделы: введение, литературный обзор, описание методов исследований, представление полученных данных и их обсуждение, выводы, список цитируемой литературы, приложения.

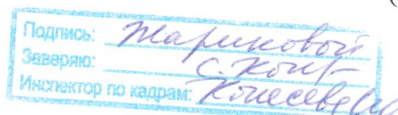
Во введении показана актуальность темы, обосновывается цель и задачи исследования. Литературный обзор отличается тщательностью, необходимо отметить его большой объем, что свидетельствует о количестве проработанных литературных источников. Материал изложен хорошо и широко освещает современное положение изучаемой проблемы. В главах, посвященных результатам исследования, подробно изложены основные итоги проведенной работы. Работа достаточно хорошо иллюстрирована, что существенно облегчает её восприятие.

Дипломная работа Перышкиной К.О. соответствует требованиям, предъявляемым к дипломным работам, может быть допущена к защите и заслуживает положительной оценки.

Рецензент:
научный сотрудник лаборатории
прикладной микробиологии УИБ РАН,

Н.В.Жарикова

(подпись)



« 22 » 06 2017 г.