

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ *OPISTHORCHIS FELINEUS*

Смагулова А.М., м.т.н., с.н.с

Киян В.С., PhD

Бекенова А.Б., докторант

Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина, Нур-Султан, [smagulova-ainura@inbox.ru](mailto:smagulova-ainura@inbox.ru)

### Аннотация

В данной статье приведены результаты эффективности применения модифицированного СТАВ-метода для выделения ДНК из половозрелой формы марит *Opisthorchis felineus*. Описанный метод применим для получения образцов с высокой чистотой и концентрацией ДНК (30-35 нг/мкл) и её использования для постановки ПЦР анализа со специфическими праймерами рибосомального (ядерного) генома *ITS2 (Internal Transcribed Spacer)*. В статье рассмотрены наиболее распространенные методы выделения ДНК: СТАВ-метод, метод выделения ДНК с помощью экстрагирующего буфера с предварительной гомогенизацией, выделение ДНК с помощью готового набора «Биосилика», которые предлагаются для более высокого выхода ДНК из трематод. Данные методы являются основными, которые используются при работе с трематодами, однако выход и чистота ДНК, получаемая этими тремя методами различна. Так, в основе методов лежат физические и химические воздействия на объект, что способствует денатурации клеточных нуклеаз. В ходе исследований были подобраны оптимальные концентрации растворов и проведены модификации всех трех методов для наилучшего выхода ДНК. Кроме этого, был разработан протокол выделения ДНК и подобрана программа для постановки ПЦР анализа.

**Ключевые слова:** выделение ДНК, постановка ПЦР, экстрагирующий буфер, СТАВ-буфер, фенол-хлороформный метод, половозрелая марита, молекулярно-генетическая диагностика, трематоды, описторхоз, амплификация

### Введение

Согласно	данным	<i>Opisthorchis felineus</i> и <i>Opisthorchis</i>
официальной	медицинской	<i>viverrini</i> , поражает более 40
статистики,	описторхоз –	миллионов жителей Европы и Азии
гельминтоз	печени, вызываемый	в год.
паразитическими	трематодами	

*O. felineus* – трематоды, поражающие желчные протоки человека и млекопитающих. *S. Rivolta* впервые обнаружил паразита в 1884 году в кошачьей печени [цит.по Blanchard R. Séance du 26 Novembre 1895], а в 1891 году русский ученый К.Н. Виноградов диагностировал его у людей в Томске и назвал его «сибирским печеночным гриппом» [цит.по Balasheva I.I., Mironova Z, 1990]. Паразит в настоящее время встречается, в основном, в Восточной Европе и на территории России, Казахстана, Украины, Белоруссии и стран Балтии. Инфекция *O. felineus* вызывает хроническое воспалительное заболевание желчных протоков у хозяев и приводит к различным симптомам (например, боли и дискомфорту в животе, рвоте, тошноте, потере веса) и осложнениям (например, холециститу, холецистохолангиту, желчнокаменной болезни). Описторхоз является патогенетическим фактором формирования брюшнотифозного носительства, которое в 12,8 раза

чаще отмечается в этой группе больных. В 3 раза чаще у таких больных встречается тяжелое течение бронхиальной астмы, в 4 раза чаще – заболевание сахарного диабета, увеличивается риск возникновения рака печени и поджелудочной железы. У женщин, больных описторхозом, в 2 раза увеличивается частота токсикозов беременности и слабость родовой деятельности [1].

*O. felineus* является паразитом человека на территории Республик бывшего СССР – Казахстана, Украины, Белоруссии, России и стран Прибалтики [2]. Центром ареала является Западная Сибирь. Описторхоз людей описан в Китае, Корее, Японии, Вьетнаме и на Дальнем Востоке России (Рисунок 1)[3, 4].

На рисунке 1, представлена карта распространения возбудителей рода *Opisthorchiidae*, где красными точками указано местообитание *O. felineus*, синими – *Metorchis bilis*, фиолетовыми – *Clonorchis sinensis*, желтыми – *O. viverrini* [5].

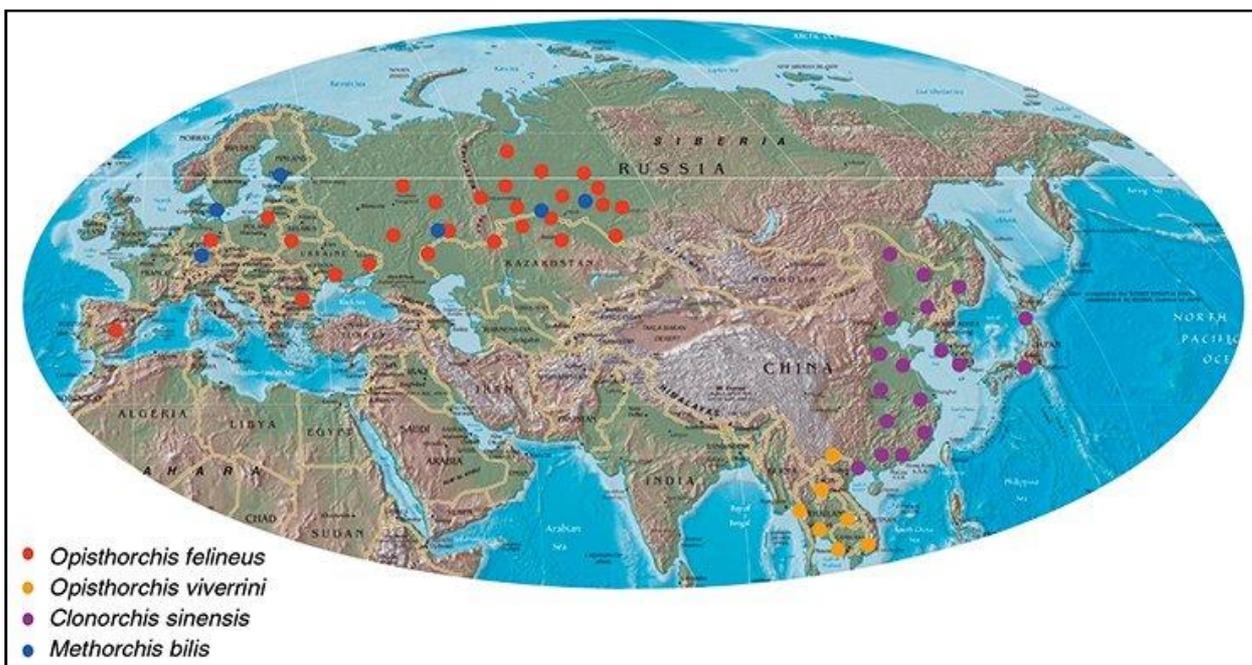


Рисунок 1 – Карта распространения возбудителей рода *Opisthorchiidae*.

В последние годы по Республике отмечается неблагоприятная эпизоотическая ситуация с выраженной эпидемической проекцией по ряду инвазионных заболеваний. По данным Агентства Республики Казахстан по защите прав потребителей ежегодно в республике регистрируется до 1500 случаев заболевания описторхозом. Наиболее неблагоприятными по описторхозу являются Акмолинская, Восточно-Казахстанская, Костанайская, Павлодарская, Карагандинская, Западно-Казахстанская, Северо-Казахстанская области. Средний многолетний показатель заболеваемости описторхозом населения по РК отмечается на уровне 13,6 на 100 тыс. населения, в ЗКО – 28,0 на 100 тыс. населения [6].

Такая тревожная ситуация по указанным паразитарным патологиям, напрямую связывается

с продовольственной безопасностью, т.к. источником инвазии является речная рыба, достаточно широко представленная в рационе питания людей. Классические методы диагностики описторхоза, позволяющие обнаружить личинки гельминта в мышцах рыбы, достоверны только при их достаточной концентрации [6, С. 2]. Это снижает степень точности и достоверности диагноза, поставленного при использовании данных методов.

При диагностике описторхоза принимаются во внимание свидетельства пребывания больного в эндемичном по описторхозу районе, клинические симптомы, данные лабораторных и инструментальных методов обследования. Окончательный диагноз описторхоза устанавливается при обнаружении яиц гельминта в фекалиях и дуоденальном содержимом [7]. Следует отметить, что в течение

первого месяца клинических проявлений описторхоза, яиц гельминтов в испражнениях обнаружить не удастся. В это время на первое место в диагностике выходят методы иммунологической и молекулярной диагностика [8].

На сегодняшний день в мире известны такие методы диагностики описторхоза как лабораторные исследования: общий анализ крови, биохимический анализ крови, анализ кала, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция [9]. Из инструментальных методов: ультразвуковое исследование органов брюшной полости, компьютерная томография и магнитно-резонансная томография органов брюшной полости, дуоденальное зондирование и исследование желчи, ретроградная панкреатохолангиография [10]. В Казахстане наиболее часто применяемые методы из выше названных – это анализ кала, иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР) [11].

Стандартным методом клинической диагностики описторхоза является копроовоскопия. Однако яйца у описторхид практически не различимы между собой, поэтому этот метод не позволяет корректно определить вид возбудителя [12]. Следует отметить, как уже отмечалось выше, в течение первого месяца клинических проявлений описторхоза, яйца гельминтов в испражнениях обнаружить не удастся.

ИФА с описторхозным антигеном используется для выявления специфических антител. Диагностическая ценность ИФА высокая в острую фазу описторхоза – более чем у 90% больных результат в ИФА положительный, и титр антител достаточно высок (1:400-1:800). В случаях выявления хронических форм описторхоза у больного, диагностическая значимость ИФА уменьшается. Титры выявляемых антител, как правило, ниже, иногда реакция может быть даже отрицательной [13]. В целом, недостатком ИФА является высокий уровень ложноположительных и ложноотрицательных результатов, высокая трудоемкость анализа.

За последние несколько лет были разработаны и усовершенствованы различные методы на основе ПЦР для обнаружения ДНК трематод яиц в образцах кала или метацеркариях во втором промежуточном хозяине, которые сегодня обладают высокой специфичностью и чувствительностью даже при низкой интенсивности инфекции по сравнению с методами прямой паразитологической и непрямой иммунологической диагностики [14].

Молекулярно-генетическая диагностика описторхоза является в настоящее время одной из наиболее приоритетных и оправданно востребованных, открывает большие перспективы не только для диагностики, но и для идентификации возбудителей. Известно, что при исследовании

описторхоза в природных очагах, наиболее актуальной задачей является точная видовая идентификация возбудителя, изучение морфофункциональных взаимосвязей паразита и дефинитивного хозяина [15]. Для проведения эффективных обследований природных очагов гельминтозов необходим метод, позволяющий проводить такую идентификацию на всех фазах жизненного цикла паразита.

К биомолекулярным методам диагностики описторхоза относятся ПЦР с её различными модификациями, которые обладают наибольшей диагностической точностью. Широкое внедрение её в клиническую практику при описторхозах позволило бы значительно улучшить качество диагностических мероприятий и предупредить осложнения и тяжелые исходы хронической описторхозной инвазии.

#### **Материалы и методы исследования**

Для проведения данного исследования отбирались три морфологически идентичные мартиты. Для достоверности результатов каждую половозрелую мартиту дополнительно делили на четыре части.

Выделение ДНК проводится с помощью коммерческого набора («Биосилика», РФ), с применением СТАВ-буфера [17] и с помощью экстрагирующего буфера (ЭБ) с предварительной гомогенизацией.

Выделение ДНК проводили тремя методами.

№1 Коммерческий набор «Биосилика». Проводили предварительный этап в выделении

Для ПЦР-диагностики описторхоза в качестве генетического маркера применяются разные составные генетического материала: транскрибируемые спейсеры *ITS1*, *ITS2*, микросателлиты генома, ретротранспозоны, что в значительной мере влияет на чувствительность методики [16].

Результаты ПЦР анализа зависят от правильности выбора метода выделения ДНК. Особенно важно учитывать компоненты буферных растворов для предварительной обработки организма, также важно учитывать рН буфера, время и градус инкубации. Всё это и многое другое напрямую зависит от чистоты выделенной ДНК.

Целью данной работы явилась проверка эффективности различных методов выделения ДНК из *O.felineus*.

ДНК с помощью набора – это использование экстрагирующего буфера (50 mM *Tris-HCl* pH-8,0; 100 mM *NaCl*; 10 mM *EDTA*; 0,5% *NP40*) и добавление 2 мкл *Proteinase K*. Готовая смесь с образцом инкубировали при 55°C два часа. Далее выделение проводили по приложенному протоколу, начиная с пункта №3.

№2 Выделение ДНК с помощью СТАВ-буфера свежего приготовления (2% СТАВ; 1,4 mM *NaCl*; 100 mM *TrisHCl* pH-8,0; 20 mM *EDTA* pH-8,0), с добавлением 2 мкл *Proteinase K*. Аналогично, как и в методе №1, проводили инкубация смеси. После инкубации

выделение проводили стандартным фенол-хлороформным методом [18]. В образец добавляли равный объем фенол-хлороформ-изоамилового спирта (25:24:1). ДНК осаждали добавлением 0,6 объема изопропанола (30 мин при +4°C), затем центрифугировали в течение 3 мин при 12 000 об/мин. Полученный осадок ДНК промывали 70% этанолом, высушивали, после чего растворяли в 50 мкл 1% TE буфера.

№3 Выделение ДНК с помощью экстрагирующего буфера с предварительной гомогенизацией. К образцу добавляли 200 мкл экстрагирующего буфера, смесь гомогенизировали металлическим пестиком. Экстракция и очистка ДНК от экстрагирующего буфера с предварительной гомогенизацией проводили стандартным фенол-хлороформным методом, описанным выше (методика №2).

Фенол-хлороформный метод (ФХ-метод) – это классический метод выделения нуклеиновых кислот (НК). Он включает в себя лизис биологического материала детергентами в присутствии

протеиназы К и экстракцию НК с помощью фенола и хлороформа. Достоинством этого метода является более высокий выход ДНК.

Аmplification маркерных генов проводили в конечном реакционном объеме 10 мкл, содержащем 1×*Phusion HF*-буфер, 2,5 мМ *MgCl<sub>2</sub>*, 1U *Phusion* ДНК-полимеразу и 200 мкМ *dNTP* (*New England Bio Labs Inc.*), 25 пмоль каждого праймера и 20 нг экстрагированной ДНК из одного образца. ПЦР проводили при следующих условиях термоциклирования: 95°C в течение 30 с, 65°C в течение 30 с и окончательная элонгация 5 мин при 72°C.

Аmplified продукты ДНК анализировали на горизонтальном электрофорезе в 1% агарозном геле с использованием 1×TAE буферного раствора и EtBr. Для определения выхода пар нуклеотидов полученных ампликонов использовали маркер *GeneRuler 100 bpPlus DNA Ladder* (*Thermo Scientific*<sup>TM</sup>).

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Объектом исследования является половозрелая форма мариго *O.felineus* (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Половозрелая форма мариты *O. felineus*

На рис. 2 видно, что половозрелая марита – это плоский червь длина которого может достигать 1 см, имеет две присоски, ротовую и брюшную. В средней части расположена матка с яйцами.

Выделение ДНК проводили с использованием коммерческого набора, с помощью свежеприготовленного СТАВ-буфера, а также экстрагирующим буфером с предварительной гомогенизацией образца. В каждый метод вносили небольшие модификации.

В методику выделения ДНК с помощью коммерческого набора «Биосилика» вносили следующие модификации в протокол. Во-первых, по протоколу в культуру клеток добавляют лизирующий буфер. В наших исследованиях мы использовали экстрагирующий буфер с *Proteinase K*. Во-вторых, по протоколу после очистки и промывки двумя буферами проводят центрифугирование смеси при 13000 об/мин 1 минуту. Для улучшения качества очистки и промывки центрифугирование проводили при 5000 об/мин в течение двух минут, что улучшает

адсорбирование выделенной ДНК на поверхности фильтра.

Согласно литературным данным СТАВ-буфер применяется для выделения ДНК из растительных объектов, а также из хитиносодержащих тканей [19]. Нами были изменены температура инкубации с 60°C на 55°C. По данным протоколов выделения ДНК инкубация проводится 25 минут, мы увеличили время инкубации до двух часов. Кроме того, дополнительно со СТАВ-буфером добавляли *Proteinase K*. Далее выделение ДНК проводили классическим фенол-хлороформным методом.

Согласно методике выделения ДНК с экстрагирующим буфером с предварительной гомогенизацией, в образцы вносятся экстрагирующий буфер и *Proteinase K*, после чего образцы помещаются в термоблок при 37°C на ночь [20]. Модификацией данного метода послужило повышение температуры и предварительная гомогенизация образца, с уменьшением времени инкубации образцов до двух часов.

Количественный анализ выделенного ДНК проводили на

спектрофотометре *NanoDrop2000* (*Thermo Fisher Scientific*, США). В результате определили, что концентрация выделенной ДНК составляет по готовому набору «Биосилика» – 5,5-8,0 нг/мкл; по СТАВ методу – 32,4-36,3 нг/мкл; по методике выделения ДНК экстрагирующим буфером с предварительной гомогенизацией – 18,7-21,0 нг/мкл. Показатели

чистоты находились в соотношении 260:280 нм.

Выделенную ДНК использовали для проведения ПЦР анализа. Постановку ПЦР проводили со специфическим праймерам *ITS2*, что позволило определить видовую принадлежность выделенных половозрелых форм марит. Основные параметры постановки реакции представлены в таблице 1.

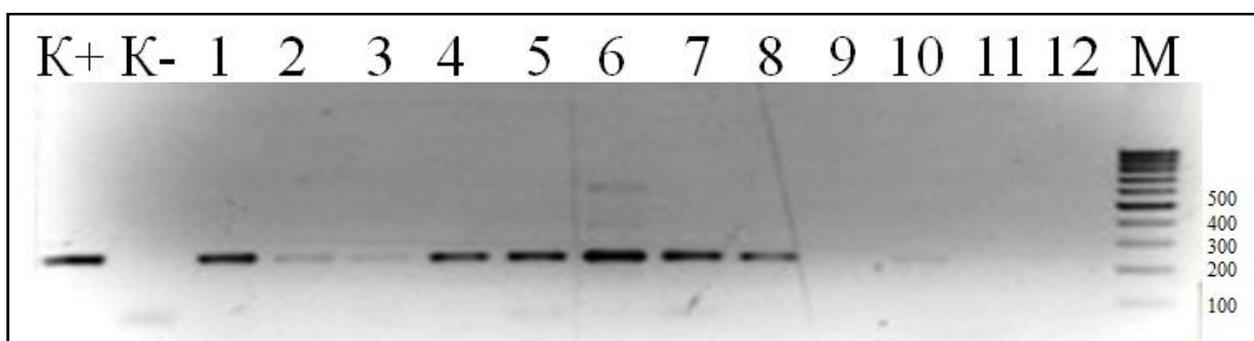
Таблица 1 – Протокол и программа постановки ПЦР

Компоненты ПЦР - $\mu$ л	Расчет на 1 образец
Буфер $\times 10$	1 мкл
MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM)	1 мкл
dNTP (10 mM)	1 мкл
Праймер ITS2 F	0,7 мкл
Праймер ITS2 R	0,7 мкл
Тaq-полимераза	0,5 мкл
MQ-вода	4.1 мкл
ДНК матрица	1 мкл

Программа амплификации была ранее отработана по основным температурным и временным показателям. Основные параметры амплификации составили: 1 этап – 95°C в течение 30 с, 2 этап – 65°C в течение 30 с,

окончательная элонгация – 5 мин при 72°C.

Для детекции результатов ПЦР анализа и визуализации ампликонов проводили электрофорез в 1% агарозном геле с добавлением *EtBr* (Рисунок -3).



1-4 – образцы ЭБ с предварительной гомогенизацией; 5-8 – СТАВ буфер;  
9-12 – набор «Биосилика»

Рисунок 3. Электрофореграмма результатов ПЦР

Как видно из результатов электрофореграммы, наилучший результат детекции ампликонов был у ДНК, выделенной СТАВ-буфером. Выход ампликонов составил 207 пар нуклеотидов, что было определено по маркерному делению. Менее результативный выход ампликонов отмечали у образцов, выделенных с помощью экстрагирующего буфера с предварительной гомогенизацией. В образцах ДНК, выделенных набором «Биосилика», результат регистрировали только в одном образце со слабой интенсивностью выхода ампликона.

Таким образом, результаты ПЦР анализа показали, что экспериментальные данные

#### **Заключение**

Для наилучшего выхода ДНК из трематод, рекомендуется использовать выделение ДНК с помощью СТАВ-буфера свежего приготовления. Выделенная с помощью данного метода ДНК отличается высоким качеством и количеством, что видно по интенсивности детекции ампликонов в электрофореграмме. Предлагается готовить СТАВ-буфер непосредственно перед применением в небольшом объеме из расчета количества выделяемых

полностью зависят от чистоты и концентрации ДНК. При выделении ДНК СТАВ-буфером были получены наиболее высокие концентрации ДНК. Это видно по электрофореграмме на рисунке 3, где 5-8 образцы имеют более интенсивные полосы ампликонов. В то же время, выделение дезоксирибонуклеиновых кислот экстрагирующим буфером с предварительной гомогенизацией и с помощью реагентов набора «Биосилика» не позволило получить высокие концентрации продукта. На электрофореграмме по слабой интенсивности полос или их отсутствию отчетливо видно, что качество выделенного ДНК было ниже.

образцов и не оставлять раствор на продолжительное хранение, так как происходит разложение СТАВ.

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта AP05131132 «ПЦР-тест для детекции и дифференциальной диагностики возбудителей описторхоза и меторхоза» на 2018-2020 гг.

#### **Список литературы**

1 Beér, S.A. Location of an opisthorchiasis focus in southern Kurgan Province. / S.A. Beér, A.I. Chernyshenko, M.M. Chilikin, G.I. Novosil'tsev, S.I. Serednitski // Med. Parazitol. Moscow, 1980 – Vol. 49, – P 78–80

2 Бээр С.А. Биология возбудителя описторхоза // Москва: Товарищество научных издательств КМК, 2005. – С. 336

3 Посохов П.С. Клонорхоз в Приамурье / Посохов П.С. // Хабаровск: Издательство Дальневосточного государственного медицинского университета, 2004. С. 187

4 Lun Z. Clonorchiasis: a key foodborne zoonosis in China / Z. Lun, R.B. Gasser, D. Lai, A. Li et al // Lancet Infectious Diseases. – 2005. – Vol.5. – P. 31–41.

5 Пальцев А.И. Системному заболеванию – системный подход // Наука из первых рук: 20 Май 2008, Описторхоз через призму генома, том 20, №2 – С. 26.

6 Патент KZ A4 30375. Праймеры для диагностики описторхоза методом ПЦР // Патент РК 2014/0768.1/ 15.09.2015, бюл. №9 / Абсатиров Г.Г., Богомаз Д.И., Кабоев О.К. [и др.]

7 Сергиев В.П. Атлас клинической и паразитологической и тропической медицины // Москва: Товарищество научных издательств КМК, 2010. – С. 280

8 Сергиев В.П. Атлас клинической и паразитологической и тропической медицины // Москва: Товарищество научных издательств КМК, 2010. – 280 с.

9 Qian M.B., Yap P., Yang Y.C. et al. J. Accuracy of the Kato-Katz method and formalin-ether concentration technique for the diagnosis of *C. sinensis*, implication for assessing drug efficacy//Parasit.Vectors. – 2013. – Vol. 6(1). – P. 314.

10 Chen J.H., Wang H., Chen J.X., Bergquist R., Tanner M., Utzinger J., Zhou X.N. Frontiers of parasitology research in the People's Republic of China: infection, diagnosis, protection and surveillance // Parasit. Vectors. – 2012. – Vol. 5. P. 221.

12 Duengai K., Sithithaworn P., Rudrappa U.K., Iddya K., Laha T., Stensvold C.R., Strandgaard H., Johansen M.V. Improvement of PCR for Detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in Human Stool Samples //Journal of clinical microbiology. – 2008. – Vol. 46(1). – P. 366–368.

13 Колчанов Н.А., Огородова Л.М., Федорова О.С., Сазонов А.Э., О-Жи-Хо Е.А., Катохин А.В., Мордвинов В.А. ДНК-диагностика микст-инвазий *Opisthorchis felinus* и *Metorchis bilis* с помощью метода ПЦР // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2010. – № 2. – С.10-13.

14 Кузнецова В.Г. Патогенетические механизмы и особенности клиники последствий перенесенного описторхоза: Автореф. дис. ... док. мед. наук. Новосибирск, 2000. – С. 31.

15 Ai L., Dong S.J., Zhang W.Y. et al. Specific PCR-based assays for the identification of *Fasciola* species: their development, evaluation and potential usefulness in prevalence surveys. Ann. Trop. Med. Parasitol. 2010; 104: 65 – 72.

16 Duengai K. Diagnosis of early infection and post chemotherapeutic treatment by copro-DNA detection in experimental opisthorchiasis / K. Duengai, T. Boonmars, J. Sithithaworn, P. Sithithaworn // Parasitol. Res. – 2013. – Vol. 112(1). – P. 271–278.

17 Duengai K. Diagnosis of early infection and post chemotherapeutic treatment by copro-DNA detection in experimental opisthorchiasis / K.Duengai,

T. Boonmars, J. Sithithaworn, P. Sithithaworn// *Parasitol. Res.* – 2013. – Vol. 112(1). – P. 271–278.

18 Рябушкина Н.А. Специфика выделения ДНК из растительных объектов / Н.А. Рябушкина, М.Е. Омашева, Н.Н. Галиакпаров // *Биотехнология. Теория и практика.* № 2 2012. – С. 15-16

19 Гуляев А.С. Способы выделения ДНК из тканей печеночных сосальщиков для последующего использования в ПЦР / А.С. Гуляев, С.К. Семенова // Одобрен секцией «Инвазионные болезни животных РАСХН 22 марта 2012 г., протокол № 1. – С. 128–129.

20 Фризен Н. Молекулярные методы, используемые в систематике растений. Барнаул: АзБука. 2007. – С. 7.

### References

1 Beer, S.A. Location of an opisthorchiasis focus in southern Kurgan Province. / S.A. Beer, A.I. Chernyshenko, M.M. Chilikin, G.I. Novosil'tsev, S.I. Serednitski // *Med. Parazitol. Moscow*, 1980 – Vol. 49, – P 78–80

2 Beer S.A. *Biologiya vozbuditelya opistorhoza* // Moskva: Tovarishestvo nauchnyh izdatelstv KMK, 2005. – S. 336

3 Posohov P.S. *Klonorhoz v Priamure* / Posohov P.S. // Habarovsk: Izdatelstvo Dalnevostochnogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta, 2004. S. 187

4 Lun Z. Clonorchiasis: a key foodborne zoonosis in China / Z. Lun, R.V. Gasser, D. Lai, A. Li et all // *Lancet Infectious Diseases.* – 2005. – Vol.5. – P. 31–41.

5 Palcev A.I. *Sistemnomu zabolevaniyu – sistemnyj podhod* // *Nauka iz pervyh ruk: 20 Maj 2008*, *Opistorhoz cherez prizmu genoma*, tom 20, №2 – S. 26.

6 Patent KZ A4 30375. *Prajmery dlya diagnostiki opistorhoza metodom PCR* // Patent RK 2014/0768.1/ 15.09.2015, byul. №9 / Absatirov G.G., Bogomaz D.I., Kaboev O.K. [i dr.]

7 Sergiev V.P. *Atlas klinicheskoy i parazitologicheskoy i tropicheskoy mediciny* // Moskva: Tovarishestvo nauchnyh izdatelstv KMK, 2010. – S. 280

8 Sergiev V.P. *Atlas klinicheskoy i parazitologicheskoy i tropicheskoy mediciny* // Moskva: Tovarishestvo nauchnyh izdatelstv KMK, 2010. – 280 s.

9 Qian M.B., Yap P., Yang Y.C. et all. J. Accuracy of the Kato-Katz method and formalin-ether concentration technique for the diagnosis of *C. sinensis*, implication for assessing drug efficacy//*Parasit.Vectors.* – 2013. – Vol. 6(1). – P. 314.

10 Chen J.H., Wang H., Chen J.X., Bergquist R., Tanner M., Utzinger J., Zhou X.N. *Frontiers of parasitology research in the People's Republic of China: infection, diagnosis, protection and surveillance* // *Parasit. Vectors.* – 2012. – Vol. 5. P. 221.

11 Duengai K., Sithithaworn P., Rudrappa U.K., Iddya K., Laha T., Stensvold C.R., Strandgaard H., Johansen M.V. *Improvement of PCR for Detection of*

*Opisthorchis viverrini* DNA in Human Stool Samples //Journal of clinical microbiology. – 2008. – Vol. 46(1). – P. 366–368.

12 Kolchanov N.A., Ogorodova L.M., Fedorova O.S., Sazonov A.E., O-Zhi-Ho E.A., Katohin A.V., Mordvinov V.A. DNK-dagnostika mikst-invazij *Opisthorchis felinus* i *Metorchis bilis* s pomoshyu metoda PCR // Medicinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni. – 2010. – № 2. – S.10-13.

13 Kuznecova V.G. Patogeneticheskie mehanizmy i osobennosti kliniki posledstvij perenesennogo opistorhoza: Avtoref. dis. ... dok. med. nauk. Novosibirsk, 2000. – S. 31.

14 Ai L., Dong S.J., Zhang W.Y. et al. Specific PCR-based assays for the identification of *Fasciola* species: their development, evaluation and potential usefulness in prevalence surveys. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2010; 104: 65 – 72.

15 Duengai K. Diagnosis of early infection and post chemotherapeutic treatment by copro-DNA detection in experimental opisthorchiasis / K. Duengai, T. Boonmars, J. Sithithaworn, P. Sithithaworn // *Parasitol. Res.* – 2013. – Vol. 112(1). – P. 271–278.

16 Duengai K. Diagnosis of early infection and post chemotherapeutic treatment by copro-DNA detection in experimental opisthorchiasis / K.Duengai, T. Boonmars, J. Sithithaworn, P. Sithithaworn// *Parasitol. Res.* – 2013. – Vol. 112(1). – P. 271–278.

17 Ryabushkina N.A. Specifika vydeleniya DNK iz rastitelnyh obektov / N.A. Ryabushkina, M.E. Omasheva, N.N. Galiakparov // *Biotehnologiya. Teoriya i praktika.* № 2 2012. – S. 15-16

18 Gulyaev A.S. Sposoby vydeleniya DNK iz tkanej pechenochnyh sosalshikov dlya posleduyushogo ispolzovaniya v PCR / A.S. Gulyaev, S.K. Semenova // Odobren sekciej «Invazionnye bolezni zhivotnyh RASHN 22 marta 2012 g., protokol № 1. – S. 128–129.

19 Frizen N. Molekulyarnye metody, ispolzuemye v sistematike rastenij. Barnaul: AzBuka. 2007. – S. 7.

## ***OPISTHORCHIS FELINEUS* ДНҚ-ЫН ӘРТҮРЛІ ӘДІСТЕРМЕН БӨЛІП АЛУДЫҢ ТИІМДІЛІГІ**

*Смагулова А.М., т.ғ.м., а.ғ.қ*

*Киян В.С., PhD, жетекшісі*

*Ауылшаруашылық биотехнологияны зерттеу платформасы*

*С. Сейфуллин атындағы Қазақ аграрлық техникалық университеті, Жеңіс*

*данғылы, 62*

*Нур-Султан қ., 010011, Қазақстан, smagulova-ainura@inbox.ru*

### **Аннотация**

Мақалада авторлар *O. felinus* маритысының жыныстық жетілген түрлерінен ДНҚ-ны бөліп алу тиімділігі туралы нәтижелерді келтірген. ДНҚ-ны бөліп алуға әртүрлі әдістердің тиісетін әсерлері алынған үлгілердегі

концентрацияны өлшеу негізінде көрсетілген, сонымен қатар ДНҚ-ның тазалығы мен концентрациясы, негізінен, трематодтарға физикалық немесе химиялық әсер етумен байланысты болған. Алынған ДНҚ ITS2 рибосомалық (ядролық) геномның арнайы праймерлерімен ПТР талдауын жүргізу үшін қолданылған. Нәтижелер 1% агарозды геледе анықталған, электрофореграммада *O. felineus* маритысынан ДНҚ-ны бөліп алудың тиімді әдісі ампликондардың жылжу жылдамдығымен салыстырылған. Зерттеу барысында оңтайлы ерітінді концентрациясы таңдалды және ДНҚ-ны мол көлемде бөліп алу үшін барлық үш әдістерге өзгертулер енгізілген. Сонымен қатар, ДНҚ бөліп алу протоколы дайындалған және ПТР талдау жасау үшін бағдарлама әзірленген.

**Түйінді сөздер:** ДНҚ бөліп шығару, ПЦР қою реакциясы, оқшалаушы буфер, СТАВ-буфері, Фенол-хлороформ әдісі, жетілген марита, молекулярлық генетикалық талдау, трематода, описторхоз, амплификациялау

## **EFFICIENCY OF VARIOUS DNA EXTRACTION METHODS FROM OPISTHORCHIS FELINEUS**

*Smagulova A.M., Master of Science, Senior Researcher  
Kiyon V.S., PhD, Head of  
Research Platform of Agricultural Biotechnology  
S.Seifullin Kazakh Agrotechnical University, 62, Zhenis Ave.  
Nur-Sultan, 010011, Kazakhstan, [smagulova-ainura@inbox.ru](mailto:smagulova-ainura@inbox.ru)*

### **Summary**

The authors of the article provided results on the efficiency of DNA isolation from adult forms of *O. felineus* maritus. The results of exposure to various methods of DNA extraction are shown in the example of measuring the concentration in the obtained samples, while we saw that the purity and concentration of DNA generally depend on physical or chemical effects on trematodes. The resulting DNA was subsequently used to perform PCR analysis with specific primers of the ITS2 ribosomal (nuclear) genome. The results were detected on a 1% agarose gel, where on the electropherogram as can be seen by the intensity of amplicon output the most effective way to isolate DNA from adult forms of *O. felineus*. In the course of the research, the optimal solution concentrations were selected and modifications were made to all three methods for the best DNA yield. Also, a DNA isolation protocol was developed and a program was selected for the production of PCR analysis.

**Keywords:** DNA isolation, PCR formulation, extracting buffer, CTA buffer, phenol-chloroform method, mature marit, molecular genetic diagnostics, trematode, opisthorchiasis, amplification