УДК 576.895.1 : 577.212

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДНК ГЕЛЬМИНТОВ ИЗ РОДОВ TRICHINELLA, FASCIOLA, ECHINOCOCCUS, NEMATODIRUS, TAENIA

© Е. А. Романова, С. К. Семенова, И. И. Бенедиктов, А. П. Рысков

В работе был использован метод полимеразной цепной реакции (PCR) со случайными праймерами для выявления полиморфизма ДНК у представителей гельминтов из классов Cestoda, Nematoda, Trematoda. RAPD-PCR маркеры были использованы для описания генетической изменчивости между отдельными семействами, родами, видами и изолятами гельминтов. В настоящем исследовании были подобраны оптимальные условия для проведения RAPD-PCR анализа и описана генетическая изменчивость у гельминтов из разных таксономических групп. Показано, что этот метод может быть успешно использован для идентификации гельминтов. В работе обсуждаются также вопросы, связанные с наличием возрастной изменчивости и гостальной специфичности изученных маркеров.

Диагностика гельминтозов человека особенно ранняя впрямую связана с четкой идентификацией возбудителей. Однако многочисленные данные, касающиеся особенностей их биологии, иммунологии, морфологии и биохимии, расширяя круг используемых характеристик, все равно часто оказываются недостаточными, а иногда только усложняют определение исследуемых объектов. Поэтому все большее внимание привлекают молекулярно-генетические методы исследования, основанные на анализе полиморфизма ДНК. Среди них наиболее часто используется полиморфизм ДНК рестрикционных фрагментов, который выявляется с помощью различных полиморфных ДНК-зондов методом блот-гибридизации. При этом обнаруживается спектр фрагментов ДНК с различной электрофоретической подвижностью, характерный для данного генома.

Такие ДНК-фингерпринты с использованием, например, зонда ДНК фага М 13 позволяют идентифицировать отдельные особи, штаммы, виды и роды у различных животных (Ryskov e. a., 1988). В частности, этот метод был ранее использован нами для анализа генетической структуры гельминтов родов *Trichinella* и *Fasciola* (Романова, 1991; Рысков и др., 1990). Метод является чрезвычайно эффективным для типирования ДНК, но отличается высокой трудоемкостью и технологической сложностью.

В настоящей работе мы продолжили изучение генетического полиморфизма ДНК гельминтов, используя сравнительно новый молекулярно-генетический метод – полимеразную цепную реакцию (PCR) со случайными праймерами (RAPD-PCR). Он основан на взаимодействии синтетических олигонуклеотидных праймеров со случайными участками ДНК, которые присутствуют в геноме гельминтов. Распределение таких участков может быть специфичным для данного вида. Кроме

того, в ходе полимеразной цепной реакции между случайными праймерами нарабатываются (амплифицируются) фрагменты ДНК, причем некоторые из них соответствуют полиморфным участкам генома. При электрофорезе наблюдается спектр амплифицированных ДНК-продуктов, характерный для каждого генотипа. Эффективность метода, т. е. возможность дифференциации генотипов, связана с подбором праймеров, условиями проведения реакции амплификации, электрофоретическим фракционированием и детекцией ДНК-продуктов. В принципе метод является менее трудоемким и позволяет выявлять маркерные участки генома у исследуемого вида. При этом, как и с ДНК-фингерпринтингом, можно решать проблемы идентификации и родства организмов.

Возможности метода ранее продемонстрированы на примере возбудителей ряда паразитарных заболеваний – лейшманий, споровиков, возбудителя малярии (Булат и др., 1992; Hancock e. a., 1992; Ellenberger e. a., 1992), а также болезнетворных грибов (Булат, Мироненко, 1990). Имеется ряд публикаций по использованию PCR для анализа гельминтов (Weiss e. a., 1991; Zurita e. a., 1988; Gottstein e. a., 1991; Bishop e. a., 1992), и лишь недавно начали применять вариант RAPD-PCR для систематики гельминтов (Arribas e. a., 1993; Bandi e. a., 1993; Dupouy-Camet e. a., 1993).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована ДНК гельминтов различных штаммов, видов и родов, относящихся к различным классам и семействам: класс Cestoda, сем. Taeniidae, роды *Taenia* (*Cysticercus ovis*) и *Ecinococcus* (*E. granulosus*); класс Trematoda, сем. Fasciolidae, *Fasciola hepatica*; класс Nematoda, сем. Trichinellidae, род *Trichinella* и сем. Trichostrongylidae, *Nematodirus spatiger*. Данные о конкретных изолятах, местах сбора материала и хозяевах приведены в таблице.

Сбор материала производился от разных животных-хозяев. Так, протосколексы эхинококка были собраны от свиней, сколексы цистицерка и нематодирусы – от овец. Взрослые особи *Fasciola hepatica* – от крупного рогатого скота (КРС) и от кролика.

Трихинелл получали после пассажей на мышах линии BALB/c, мышечных личинок выделяли стандартным методом переваривания в искусственном желудочном соке.

Использовались следующие изоляты трихинелл: *T. spiralis* – от свиньи, использовали многократные пассажи на лабораторных мышах; от медведя, личинки были выделены после первого пассажа на мышах, от лисы – после второго пассажа; от волка и от кабана личинок выделяли после второго пассажа.

T. pseudospiralis – от свиньи, личинки были выделены после многократных пассажей на мышах.

Половозрелые мариты *F. hepatica*, достигавшие 1.1–1.9 см длины, были собраны из печени крупного рогатого скота в нескольких районах Курской и Калужской обл. Кроме того, из КРС в одном из районов Курской обл. были получены и молодые фасциолы (0.6–0.9 см).

Во всех случаях (за исключением фасциол) ДНК выделяли из смеси личинок, полученных от одного животного. У фасциол можно было выделить ДНК отдельной особи, поэтому мы провели сравнение ДНК единичной фасциолы и смеси нескольких фасциол из одной и той же печени.

Выделение и очистку ДНК проводили стандартным фенол-хлороформным методом с использованием протеиназы К и последующим осаждением этанолом.

Реакцию амплификации проводили по стандартной методике (Saiki e. a., 1988) в объеме 25 мкл, содержащем 60 мМ Трис-HCl, 10 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 % Твин 20, по 100 мкМ dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 0.1 мкМ праймера, 25 ng геномной ДНК, 0.5 еди-

Изоляты, виды и роды гельминтов, использованных в работе

Parasite isolates and species used in this study

Вид, изолят	Регион	Хозяин	Год	Возрастная стадия
Echinococcus granulosus	Средняя Азия	Свинья	1990	Личинки
Taenia (*Cysticercus ovis*)	Ивановская обл.	Овца	1991	„
Trichinella spiralis	Белоруссия	Свинья	1965	„
T. spiralis v. *nativa*	Чехия	Волк	1992	„
	Краснодарский край	Медведь	1992	„
T. spiralis v. *nelsoni*	Чехия	Лиса	1992	„
T. pseudospiralis	Тульская обл.	Свинья	1985	„
Fasciola hepatica	Курская обл.	КРС[+]	1992	Взрослые
	Калужская обл.	КРС	1992	„
		Кролик[++]	1992	„
	Курская обл.	КРС	1992	Молодые
Nematodirus spatiger	Ростовская обл.	Овца	1990	Взрослые

Примечание. [+]КРС – крупный рогатый скот. [++]Кролик – экспериментальное заражение.

ниц Taq-полимеразы. В качестве контроля использовали пробу, содержащую полную амплификационную смесь, но без добавления ДНК.

В работе использовали несколько олигопраймеров следующего состава: п1 – 5′-ACCGGGAGACGG(AG)GTCTCGCT, п2 – 5′-CCGGCCTTAC, п3 – 5′-CGCCCATGGTT AGACTTAGT, п4 – 5′-GCTTAGCCGAATTGGC, п5 – 5′-GTAAAAGGACGGCCAGT.

Амплификацию проводили на амплификаторах НПО, Санкт-Петербург и „MJ Research" в течение 35 циклов.

Использовали следующие циклы амплификации: 2 мин при 42–55° (отжиг), 2 мин при 72° (синтез), 1 мин при 94° (денатурация). В пробирку с амплифицированным образцом вносили 50 мкл хлороформа, перемешивали, центрифугировали на микроцентрифуге 30 сек. Отбирали водную фазу, содержащую амплифицированную ДНК, и анализировали продукт амплификации в 1.5–2 %-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия. В качестве маркеров молекулярного веса использовали ДНК фага лямбда, гидролизованную рестриктазой Hind III, и ДНК плазмиды pBR 322, гидролизованную рестриктазой Mva I. Окрашенные гели фотографировали в УФ-свете. В работе приводятся оригинальные фотографии и схематические изображения спектров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1. приведены спектры ДНК продуктов *Fasciola hepatica*, полученных с помощью PCR и фракционированных электрофорезом в агарозном геле с использованием пяти различных праймеров. Для каждого из этих праймеров производился подбор соответствующих условий PCR-анализа (буферные системы, температурный режим и др.).

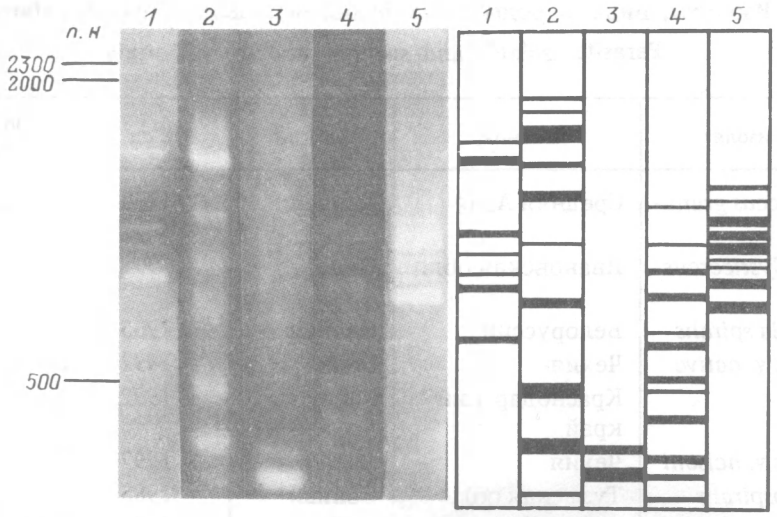


Рис. 1. Спектр ДНК *Fasciola hepatica*, полученный при использовании пяти праймеров: *1* – п5, *2* – п4, *3* – п3, *4* – п2, *5* – п1.

Fig. 1. RAPD-RCR patterns of liver fluke *Fasciola hepatica* produced using five random primers: *1* – primer 5, *2* – primer 4, *3* – primer 3, *4* – primer 2, *5* – primer 1.

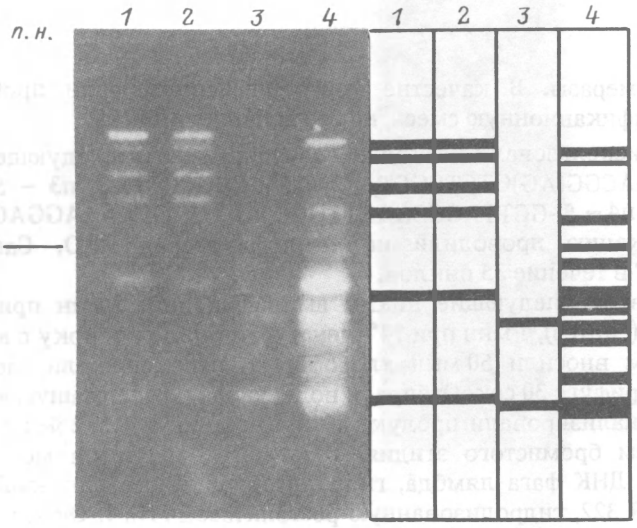


Рис. 2. ПЦР-спектры, полученные с использованием праймера 5 для ДНК *Trichinella pseudospiralis* (*1, 2*), *Trichinella spiralis* (*3*), *Echinococcus granulosus* (*4*).

Fig. 2. RAPD-PCR patterns produced using primer 5 for DNA of *Trichinella pseudospiralis* (*1, 2*), *Trichinella spiralis* (*3*), *Echinococcus granulosus* (*4*).

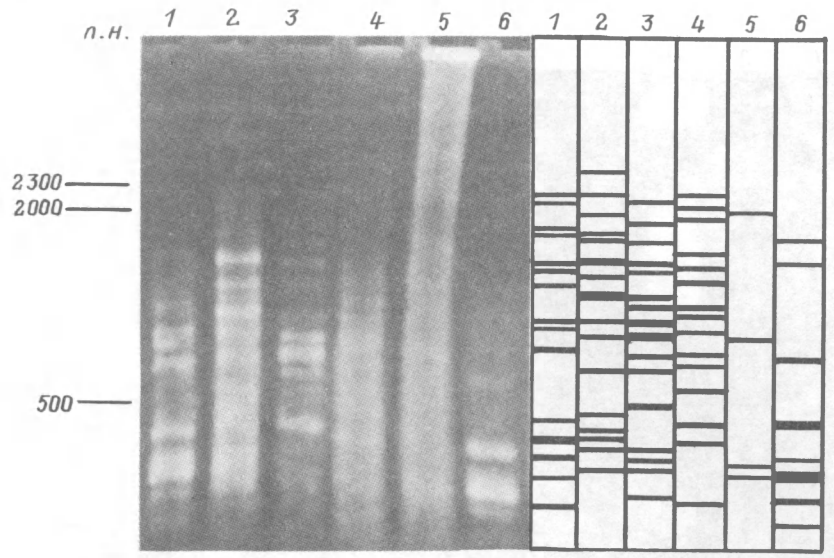


Рис. 3. ПЦР-спектры, полученные с использованием праймера 1 для ДНК *Trichinella spiralis* (*1*), *T. spiralis* v. *nativa* (*2* – волк, *3* – медведь), *T. spiralis* v. *nelsoni* (*6*), *Echinococcus granulosus* (*4*), *Cysticercus ovis* (*5*).

Fig. 3. RAPD-PCR patterns produced using primer 1 for DNA of *Trichinella spiralis* (*1*), *Trichinella spiralis* v. *nativa* (*2* – volf, *3* – bear), *Trichinella spiralis* v. *nelsoni* (*6*), *Echinococcus granulosus* (*4*), *Cysticercus ovis* (*5*).

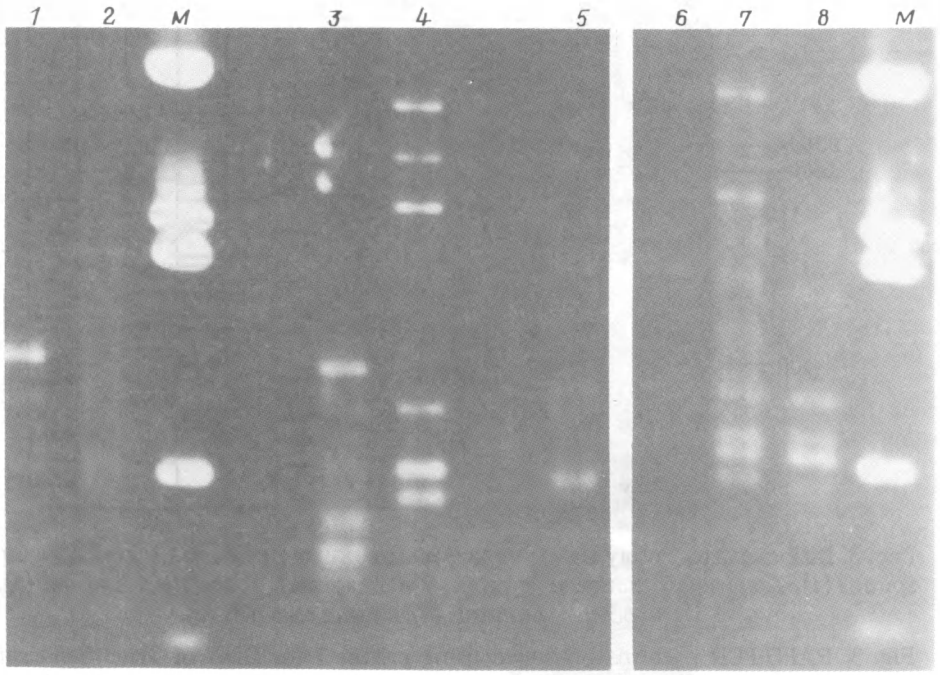
Можно отметить существенные различия в спектрах распределения ДНК в зависимости от использованного праймера. Основная зона распределения лежит в области от 2 до 0.5 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.). Видно, что из пяти использованных праймеров лишь п1, п2 и п5 были достаточно эффективны и давали большое количество интенсивных полос.

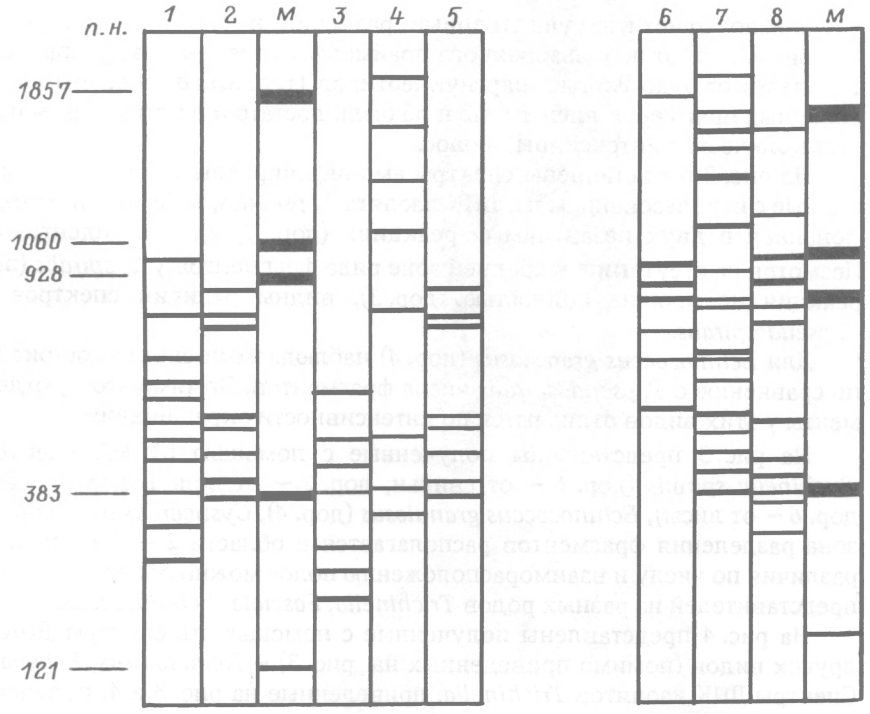
На рис. 2 представлены спектры амплифицированных ДНК гельминтов, полученные с использованием п5. ДНК изолята *T. pseudospiralis* (от свиньи), амплифицированная в двух независимых реакциях (дор. *1*, *2*), дает идентичные спектры. Несмотря на отсутствие в средней зоне ряда фрагментов у *T. spiralis* (по-видимому, реакция не прошла полностью, дор. *3*), видны отличия спектров *T. spiralis* и *T. pseudospiralis*.

Для *Echinococcus granulosus* (дор. *4*) наблюдаемый спектр состоит из большего по сравнению с *T. pseudospiralis* числа фрагментов. Помимо этого, отдельные фрагменты у этих видов отличаются по интенсивности окрашивания.

На рис. 3 представлены полученные с помощью п1 PCR-спектры изолятов *Trichinella spiralis* (дор. *1* – от свиньи, дор. *2* – от волка, дор. *3* – от медведя и дор. *6* – от лисы), *Echinococcus granulosus* (дор. *4*), *Cysticercus ovis* (дор. *5*). Основная зона разделения фрагментов располагается в области 2 – 0.2 т. п. н. Наибольшие различия по числу и взаиморасположению полос можно обнаружить при сравнении представителей из разных родов *Trichinella*, *Fasciola*, *Echinococcus*.

На рис. 4 представлены полученные с помощью п1 спектры ДНК нескольких других видов (помимо приведенных на рис. 3) – *Nematodirus*, *F. hepatica* и *C. ovis*. Спектры ДНК изолятов *Trichinella*, приведенные на рис. 3 и 4, получены в одной и


1
2
м
3
4
5
6
7
8
м


п.н.
1857
1060
928
383
121
1
2
м
3
4
5
6
7
8
м

той же реакции амплификации. Разделение амплифицированных продуктов проводили в 1.2 %-ном (рис. 4) и 1.5 %-ном агарозных гелях (рис. 3). Очевидно, что спектры ДНК имеют видовую специфичность и значительно различаются между собой.

На рис. 5 и 6 приведены результаты анализа ДНК представителей родов *Taenia*, *Echinococcus*, *Fasciola*, *Nematodirus* и *Trichinella*. В качестве случайного праймера использовали п2.

Echinococcus granulosus и *Cysticercus ovis* резко отличаются между собой по ДНК-спектрам, полученным с помощью п2, очевидны их отличия и от распределения фрагментов у *Fasciola hepatica*. Следует отметить, что для каждой из изученных ДНК мы проводили неоднократные амплификации, и в работе приведены типичные результаты, подтверждающиеся в разных экспериментах. Мы также анализировали фасциол (рис. 5), выделенных из печени крупного рогатого скота (КРС) – дор. *3–5*, *7–9* и экспериментально зараженного кролика (дор. *6*). О региональной изменчивости ДНК фасциол можно судить при сравнении ДНК-спектров фасциол, выделенных из печени двух коров из Курской (дор. *7*, *8*) и одной коровы из Калужской (дор. *9*) областей. Помимо этого, сравнивали спектры ДНК единичной фасциолы (дор. *5*) и смеси ДНК пяти фасциол (дор. *4*), выделенных из печени одного и того же животного.

Возрастная изменчивость продемонстрирована при сравнении спектров ДНК половозрелых (дор. *7*, *8*) и неполовозрелых (дор. *3*) фасциол, выделенных из печени КРС одной и той же области (Курской). При таком подходе нам не удалось обнаружить достоверные отличия в спектрах ДНК единичной особи и смеси ДНК от пяти особей.

Также не найдены изменения в спектре у фасциол от двух коров из Курской обл. Между фасциолами от КРС из двух разных областей найдены небольшие достоверные отличия, заключающиеся в изменении взаиморасположения 3–4 фрагментов.

Наибольшие различия среди фасциол найдены при сравнении ДНК фасциол из печени КРС и кролика. В спектре фасциол кролика заметно не только явное уменьшение числа амплифицированных фрагментов (8 вместо 11–14 у КРС), но и появление двух специфичных фрагментов (в области 380 и 1060 п. н.).

Различия между *F. hepatica* и *C. ovis* продемонстрированы на рис. 6, где помимо представителей Trematoda и Cestoda изображены спектры амплифицированной ДНК представителей класса Nematoda: трех изолятов *T. spiralis* и *Nematodirus*. Как и при использовании п1 (рис. 4), наибольшие различия обнаружены между спектрами представителей четырех родов – *Trichinella*, *Nematodirus*, *Fasciola*, *Taenia*. Изоляты трихинелл отличались между собой значительно меньше, так как для всех трихинелл число совпадающих фрагментов ДНК весьма значительно.

Рис. 4. ПЦР-спектры, полученные с использованием праймера 1 для ДНК *Fasciola hepatica* (*1* – Калужская обл., *3* – Курская обл.); *Cysticercus ovis* (*2*, *5*), *Nematodirus spatiger* (*4*), *T. spiralis* v. *nelsoni* (*6*), *T. spiralis* v. *nativa* (*7* – волк, *8* – медведь).

M – маркер молекулярных масс pBR 322/Mva. I.

Fig. 4. RAPD-PCR patterns producel using primer 1 for DNA, of *Fasciola hepatica* (*1* – Kaluga region, *3* – Kursk region), *Cysticercus ovis* (*2*, *5*), *Nematodirus spatiger* (*4*), *Trichinella spiralis* v. *nelsoni* (*6*), *T. spiralis* v. *nativa* (*7* – volf, *8* – bear).

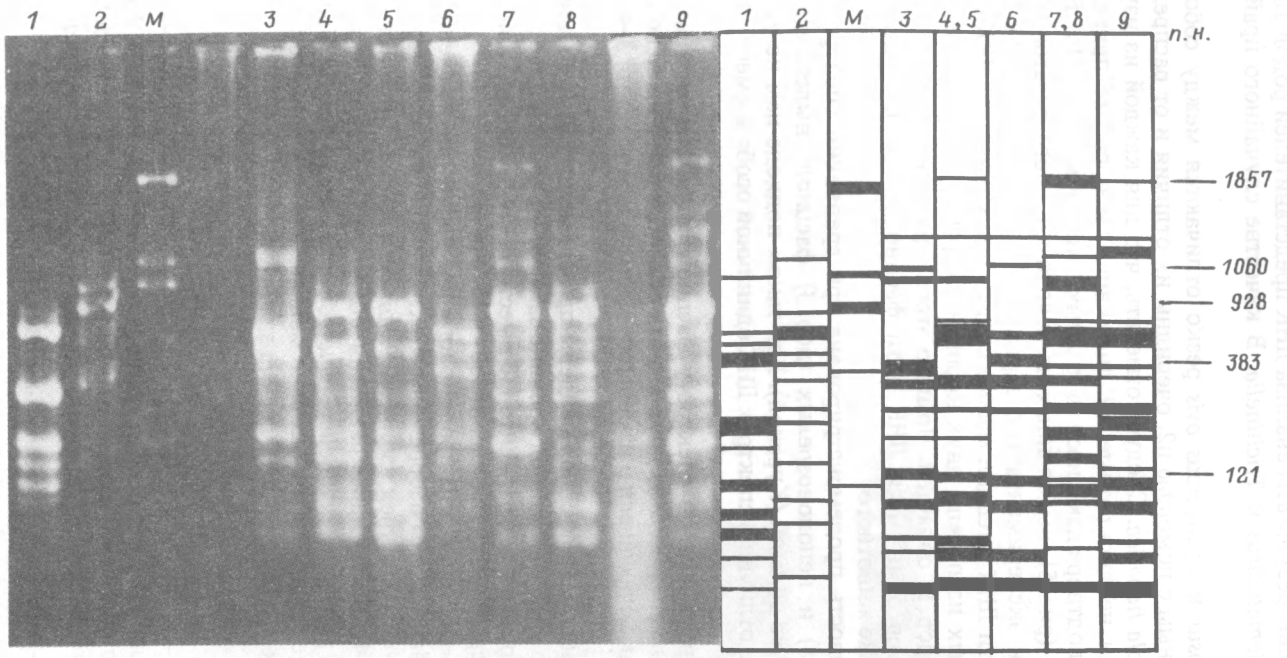


Рис. 5. ПЦР-спектры, полученные с использованием праймера 2 для ДНК *Cysticercus ovis* (*1*), *Echinococcus granulosus* (*2*) и *Fasciola hepatica* (*3–9*). ДНК *F. hepatica* выделена из неполовозрелых фасциол (*3*), из смеси пяти особей фасциол (*4*) и единичной фасциолы (*5*), из печени кролика (*6*), из печени КРС Курской (*7, 8*) и Калужской (*9*) областей.

Обозначения такие же, как на рис. 4.

Fig. 5. RAPD-PCR patterns produced using primer 2 for DNA of *Cysticercus ovis* (*1*), *Echinococcus granulosus* (*2*) and *Fasciola hepatica* (*3–9*) DNA of *Fasciola hepatica* was selected from immature (*3*) liver fluke, from mixture of five (*4*) and single flukes (*5*), from some flukes obtained from the rabbit liver (*6*), from some flukes of cattle from Kursk (*7, 8*) and Kaluga (*9*) regions.

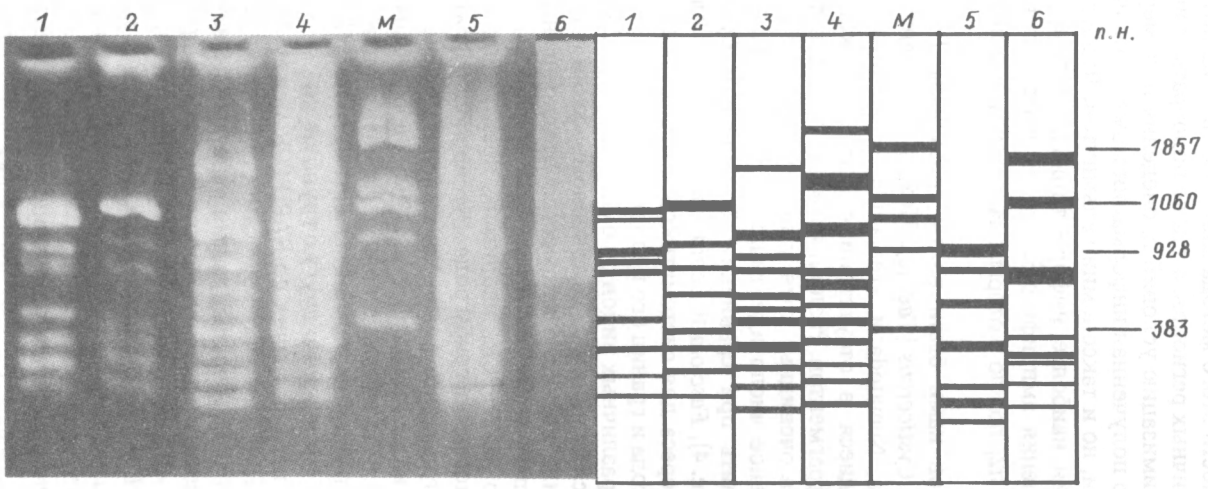


Рис. 6. ПЦР-спектры, полученные с использованием праймера 2 для ДНК *T. spiralis* v. *nativa* (*1* – волк), *T. spiralis* v. *nelsoni* (*2*), *T. spiralis* (*3*), *Nematodirus spatiger* (*4*), *Cysticercus ovis* (*5*), *Fasciola hepatica* (*6*).

Обозначения такие же, как на рис. 4.

Fig. 6. RAPD-PCR patterns produced using primer 2 for DNA of *Trichinella spiralis* v. *nativa* (*1* – volf), *T. spiralis* v. *nelsoni* (*2*), *T. spiralis* (*3*), *Nematodirus spatiger* (*4*), *Cysticercus ovis* (*5*), *Fasciola hepatica* (*6*).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе использовали сравнительно новый молекулярно-генетический метод для идентификации и дифференциации представителей разных семейств, родов, видов и внутривидовых изолятов гельминтов. Перед нами стояла задача продемонстрировать возможности этого метода для геномной идентификации гельминтов, полученных из различных регионов, а также подобрать олигонуклеотидные праймеры и провести оптимизацию условий проведения полимеразной цепной реакции. Предполагалось, что полученная информация может быть использована не только для идентификации, но и таксономии гельминтов. Подбор праймеров осуществляли для выявления наиболее информативных (полиморфных) маркеров. Исходя из картин разделения амплифицированных фрагментов ДНК, мы остановились на праймерах п1, п2, п5, по которым обнаружена наибольшая вариабельность ДНК.

Для целей идентификации родов нами были взяты гельминты *Trichinella*, *Nematodirus*, *Fasciola*, *Echinococcus* и *Cysticercus* (*Taenia*). Между представителями трех классов гельминтов – Cestoda, Nematoda и Trematoda – найдены весьма значительные различия, заключающиеся в отсутствии общих, одинаковых по электрофоретической подвижности фрагментов. Различия между представителями пяти изученных родов также весьма очевидны, хотя у некоторых видов можно обнаружить в спектрах незначительное число идентичных фрагментов. Так, по 2–3 общих фрагмента можно выявить при сравнении *Trichinella* и *Cysticercus* (рис. 3), *Trichinella* и *Nematodirus* (рис. 4), *Fasciola* и *Echinococcus* (рис. 5). Эта часть работы не представляет особого интереса для систематиков и необходима скорее для демонстрации возможностей метода и границ его использования.

Идентификация представителей различных видов с помощью RAPD-PCR сейчас довольно широко используется в исследованиях, где таксономический ранг представителей еще недостаточно ясен или возникло множество неоднозначных данных. Это, в частности, относится к паразитологии и гельминтологии. Так, достаточно хорошо изучены с помощью RAPD-PCR, например, представители рода *Schistosoma* (Neto e. a., 1993) и фитопатогенные грибы рода *Pyrenophora* (Булат и др., 1990). Среди работ, посвященных гельминтам, можно выделить исследования рода *Trichinella*. В частности, в публикациях (Bandi e. a., 1993; Dupouy-Camet e. a., 1993; Arribas e. a., 1993) отмечается различная степень дифференциации между изолятами трихинелл. В результате в одну группу включены *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa*, а *T. pseudospiralis* и *T. nelsoni* выделены в другую группу.

Согласно нашим данным, полученные различия по RAPD-PCR между *T. spiralis* и *T. pseudospiralis* позволяют рассматривать их как самостоятельные группы (виды). Эти результаты совпадают с нашими предыдущими работами по изучению ДНК этих гельминтов методом геномной дактилоскопии (Рысков и др., 1990). Различия, обнаруженные нами между представителями группы *Trichinella*: *T. spiralis*, *T. spiralis* v. *nativa*, *T. spiralis* v. *nelsoni*, не столь очевидны, как для *T. spiralis* и *T. pseudospiralis*. При сравнении спектров ДНК изолятов *Trichinella* мы обнаружили по 3–5 идентичных фрагментов, что свидетельствует о значительном сходстве их геномов, т. е. о значительном родстве. Однако полученных нами данных пока еще недостаточно для объединения отдельных изолятов в группы. Этот вопрос требует дополнительного изучения с привлечением большего числа праймеров.

В настоящей работе нам удалось обнаружить внутривидовую изменчивость RAPD-маркеров при сравнении спектров ДНК печеночного сосальщика от коров из разных регионов России. Так, найдены отличия по 2–3 фрагментам в спектрах ДНК *Fasciola hepatica* из Курской и Калужской обл. Сходную картину мы наблюдали ранее при сравнении геномно-дактилоскопических отпечатков фасциол из

Московской обл. и Мордовии (Рысков и др., 1990; Романова, 1991). О внутривидовой гетерогенности свидетельствуют также белковые спектры *F. hepatica* (Клименко, Сазанов, 1972). Наличие региональной межпопуляционной изменчивости по RAPD-маркерам характерно и для других видов гельминтов – *Schistosoma* (Neto e. a., 1993), *Taenia* (Gottstein e. a., 1991). Помимо региональных, нам удалось обнаружить различия в спектре амплифицированной ДНК у фасциол, находящихся на разных стадиях жизненного цикла. Эти различия заключались не только в изменении интенсивности окрашивания отдельных фрагментов, но и в изменении спектра распределения фрагментов в области 250–900 п. н. В качестве объяснения полученного результата можно предположить наличие онтогенетических модификаций ДНК (например, метилирование, образование ковалентных сшивок с белками и др.), влияющих на параметры полимеразной цепной реакции и приводящих к изменению спектра амплифицированных ДНК-продуктов. Очевидно, что этот вопрос требует отдельного изучения.

Интересным представляется вопрос об изменчивости, наблюдаемой при смене хозяина гельминта. Отношения паразит–хозяин являются центральными в гельминтологии. До сих пор актуален вопрос о влиянии хозяина на структуру генома паразита. По имеющимся в нашем распоряжении данным трудно объяснить причины, лежащие в основе изменения амплификационного спектра у фасциол в разных хозяевах – кроликах или крупном рогатом скоте. Мы можем лишь утверждать, что уровень изменений в спектрах фасциол от кролика и КРС сопоставим с уровнем изменений в спектрах изолятов рода *Trichinella*, которые различаются по виду животного-хозяина (лиса, волк, медведь, свинья). Однако эта сложная проблема может быть решена лишь при комплексном подходе с участием гельминтологов и молекулярных биологов.

Таким образом, в настоящей работе оптимизированы условия и проведен RAPD-PCR-анализ представителей разных семейств, родов, видов и изолятов гельминтов. Описана генетическая изменчивость гельминтов разных таксономических рангов. Показано, что RAPD-PCR позволяет проводить идентификацию гельминтов и при использовании широкого набора праймеров может дать полезную информацию для их таксономии.

Авторы благодарят Бессонова А. С. за помощь в выполнении и обсуждении настоящей работы. За предоставление лабораторных животных и инвазионного материала авторы выражают благодарность Бережко В. К., Селюнину В. А., Скире В. Н. и Халиной Р. Р.

Работа выполнена частично на средства Российского фонда фундаментальных исследований и ГНТП „Биоразнообразие".

Список литературы

Булат С. А., Мироненко Н. В. Видовая идентичность фитопатогенных грибов Pyrenophora teres Drechsler и P. graminea Ito et Kuribayashi // Микология и фитопатология. 1990. Т. 24, вып. 5. С. 435–441.

Булат С. А., Стрелкова М. В., Сысоев В. В. Идентификация маркерных штаммов Leishmania major, L. turanica, L. gerbilli методом полимеразной цепной реакции с универсальным праймером // Мед. паразитол. 1992. № 1. С. 21–22.

Клименко В. В., Сазанов А. М. Возможность дифференциации некоторых видов трематод и их промежуточных хозяев методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле // Тр. ВИГИС. 1972. Т. 19. С. 102–105.

Романова Е. А. Анализ фасциол методом геномной дактилоскопии // Тез.

докл. Всесоюз. науч. конф. „Методы профилактики и борьбы с трематодозами человека и животных". Сумы, 1991. С. 99.

Рысков А. П., Романова Е. А., Бенедиктов И. И., Пенькова Р. А. Анализ генетического полиморфизма возбудителей гельминтозных заболеваний // Вестн. с.-х. науки. 1990. № 6. С. 147–149.

Arribas B., Siles M., Bolas F., Martinez A. R. Randomly amplified DNA polymorphism within Trichinella species and isolates // Eighth International Conference on Trichinelloosis. Orvieto (Italy), 1993. Abstract book. P. 10.

Bandi C., La Rosa G., Comincini S., Tasciotti L., Damiani G., Wang G., Pozio E. Microtaxonomy of Trichinella spp.: consistency of results obtained by RAPD and isozyme analyses // Eighth International Conference on Trichinellosis. Orvieto, 1993. Abstract book. P. 12.

Bishop R., Sohanpal B., Karinki D. P., Young A. S. Detection of carrier State in Theileria parva – infected cattle by the polymerase chain reaction // Parasitology. 1992. Vol. 104, N 2. P. 215–232.

Dupouy-Camet J., Robert F., Guillou J. P., Vallet C., Perret C., Soule C. Genetic analysis of Trichinella isolates with random amplified polymorphic DNA markers // Eighth International Conference of Trichinellosis. Orvieto, 1993. Abstract book. P. 51.

Ellenberger D. L., Pieniazek N. J., Mian I. S., Eberhard M. L., Lammie P. J. Cloning and characterization of the Wuchereria bancrofti S15 ribosomal protein // Molecular and Biochemical Parasitology. 1992. Vol. 52, N 1. P. 131–135.

Gottstein B., Deplazes P., Tanner I., Skaggs J. S. Diagnostic identification of Taenia saginata with the polymerase chain reaction // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1991. Vol. 82, N 2. P. 248–249.

Hancock V., Christodoulou C., Jackson H. C. Exploitation of A 650 bp probe for quantification of Pneumocystis carini // Eur. J. Parasitol. 1992. Vol. 28, N 3. P. 342.

Neto D. E., Souza C. P., Rolinson D., Katz N., Pena S. D., Simpson A. J. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species Schistosome // Mol. Bioch. Parasitol. 1993. Vol. 57, N 1. P. 83–88.

Ryskov A. P., Jincharadze A. G., Prosnyak M. I., Ivanov P. L., Limborska S. A. M 13 phage DNA as a universal marker for DNA fingerprint of animals, plants and microorganisms // FEBS Letters. 1988. Vol. 233. P. 388–392.

Saiki R. K., Gelfend D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a termostable DNA polymerase // Science. 1988. Vol. 239. P. 487–491.

Weiss H. M., Udem S. A., Salgo M., Tanowitz H. B., Wittner M. Sensitive and specific detection on Toxoplasma DNA in an experimental murine model: use of Toxoplasma gondii-specific cDNA and the polymerase chain reaction // J. Infect. dis. 1991. Vol. 163, N 1. P. 180–186.

Zurita M., Bieber D., Ringold G., Mansour T. E. cDNA cloning and gene characterization of the mitochondrial large subunit (LSU) rRNA from the liver fluke Fasciola hepatica // Nucleic Asids Res. 1988. N 16. P. 7001–7012.

ВИГИС, Москва, 117259
Институт биологии гена РАН
Москва, 117344

Поступила 11.10.1994

AN EMPLOYMENT OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THE DNA IDENTIFICATION OF PARASITIC HELMINTS OF THE GENERA TRICHINELLA, FASCIOLA, ECHINOCOCCUS, NEMATODIRUS, TAENIA

E. A. Romanova, S. K. Semyonova, I. I. Benedictov, A. P. Ryskov

Key words: Helmints, PCR, RAPD, genetic variation, taxonomy.

SUMMARY

We have used the polymerase chain reaction (PCR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) method to identify DNA polymorphism in three classes of helmints, Cestoda, Nematoda and Trematoda. In this study, RAPD markers have been used for a description of the genetic variability between the families, genera, species and isolates of helmints. We optimized the conditions of the RAPD analysis and revealed the genetic variability of helmints belonging to different taxonomic groups.

These results show that the RAPD-PCR method can be considered as a suitable technic for a phylogenetic study of helmints. The pbroblem of an age variability and host specificity of RAPDs markers is discussed.