



УДК 577.113.083

НОВЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ ДРОЖЖЕЙ И ГРИБОВ: ПОЛУЧЕНИЕ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОЧНЫХ ОБОЛОЧЕК И ИХ ПРЯМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ПЦР

© 2002 г. В. Н. Данилевич[#], Е. В. Гришин

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 26.02.2001 г. Принята к печати 21.06.2001 г.

Разработан простой и быстрый метод приготовления образцов дрожжевых и грибных ДНК для ПЦР-амплификации. Сущность использованного подхода заключается в депротеинизации и очистке ДНК от липидных, полисахаридных и других примесей путем высокотемпературной (кипящая водяная баня) экстракции вышеуказанных компонентов буферными растворами, содержащими соли-хаотропы, без разрушения клеточных стенок дрожжей или грибного мицелия. Получаемые при этом клеточные оболочки с ДНК и РНК, как оказалось, можно непосредственно использовать в ПЦР. Предложенную разновидность ПЦР мы назвали “ПЦР на ДНК-содержащих клеточных оболочках” (PCR using DNA-containing cell envelopes).

Ключевые слова: дрожжи и мицелиальные грибы; экстракция белков и липидов; ДНК-содержащие клеточные оболочки; выделение геномной ДНК; ПЦР-амплификация.

ВВЕДЕНИЕ

Дрожжи и мицелиальные грибы широко распространены в природе и имеют большое практическое значение. Грибковые инфекции вызывают различного рода заболевания у растений, животных и человека. В то же время грибы являются продуcentами антибиотиков, ферментов, витаминов и других биологически активных веществ. Плодовые тела совершенных грибов используются в пищу, дрожжи – в биотехнологии (пекарское дело, виноделие, пивоварение).

В связи с большой практической значимостью дрожжи и грибы интенсивно изучаются традиционными микологическими и генетическими методами. В настоящее время для исследования биологии, генетики и эволюции этих организмов привлекаются современные молекулярно-генетические методы. Одним из таких методов, используемых в диагностике и таксономии дрожжей и грибов, является полимеразная цепная реакция (ПЦР) с генспецифическими (исходный вариант ПЦР [1]), а также с неспецифическими праймерами (РАПД-ПЦР (RAPD PCR) [2]; АП-ПЦР (AP PCR) [3]; УП-ПЦР (UP PCR) [4]).

При постановке ПЦР необходимо иметь в наличии в достаточном количестве ДНК с минимальным содержанием белков и других примесей. Основная проблема при выделении ДНК из грибного материала – как наиболее эффективно разрушить их клеточные стенки, для того чтобы с максимальным выходом экстрагировать ДНК. Как известно, дрожжи и мицелиальные грибы обладают прочной клеточной стенкой, которая устойчива к действию большинства лизических агентов. В отличие от нежных клеточных стенок грамотрицательных микроорганизмов, которые легко разрушаются под воздействием ряда химических и физических факторов, клеточные стенки дрожжей и грибов очень прочны и выдерживают обработку растворами детергентов, щелочей и солей-хаотропов. Клеточные стенки различных дрожжей и мицелиальных грибов при этом сильно различаются по своей прочности: некоторые настолько прочны, что выделить из них ДНК, используя стандартные методические подходы, довольно проблематично.

Известны следующие традиционные методы разрушения дрожжевых клеток и грибного мицелия при выделении ДНК: 1) интенсивное встряхивание со стеклянными шариками; 2) размалывание с помощью ступки и пестика; 3) механическая гомогенизация; 4) ультразвуковая обработка; 5) обработка лизическими ферментами; 6) использование пресса Френча [5, 6].

Метод встряхивания со стеклянными шариками – один из наиболее часто используемых. Впер-

Сокращения: УП-ПЦР (universal primed PCR) – ПЦР с длинными (15–20 звеньев) универсальными праймерами; РАПД-ПЦР = АП-ПЦР (arbitrarily primed PCR) – ПЦР с короткими (10 звеньев) универсальными праймерами; НК – нуклеиновые кислоты.

[#]Автор для переписки (эл. почта: dan@mail.ibch.ru; тел.: (095) 336-65-40; факс: (095) 330-73-01).

вые он разработан применительно к дрожжам [7], однако оказался эффективным и в случае мицелиальных грибов с умеренно прочной клеточной стенкой [6]. Поскольку процесс проводится в одноразовых центрифужных пробирках, параллельно удается обрабатывать много образцов.

С помощью ступки и пестика можно выделить ДНК практически из любых грибных объектов, однако методика не подходит для одновременной работы с несколькими образцами. Ограничивающим моментом этого способа является необходимость тщательного мытья инструментов после каждого нового объекта.

Универсален метод разрушения дрожжевых клеток (грибного мицелия), замороженных в жидком азоте, с помощью высокоскоростных механических гомогенизаторов. Недостаток этого способа – сильная фрагментация ДНК. Мицелиальные грибы с умеренно прочными клеточными стенками могут быть разрушены также и при комнатной температуре посредством высокоскоростной гомогенизации в присутствии солей-хаотропов [8]. Ограничивающим фактором здесь также является необходимость стерилизации повторно используемого оборудования с целью предотвращения загрязнения образцов чужой ДНК.

Что же касается использования литических ферментов (зимолиазы или литиказ) [9–11], то ог-

раничения здесь связаны с высокой стоимостью этих ферментов, длительностью процесса и резистентностью большинства дрожжевых и грибных объектов по отношению к ферментативному лизису.

Известен также метод экстракции ДНК из дрожжей и мицелиальных грибов путем прогрева клеток (мицелия) при 65°C в буфере с 3% SDS, с последующей депротеинизацией ДНК смесью фенола с хлороформом [12].

Таким образом, выделение ДНК из дрожжей и мицелиальных грибов все еще является трудоемкой, дорогой и длительной процедурой.

Мы предлагаем совершенно новый подход для приготовления образцов ДНК из дрожжей и мицелиальных грибов для ПЦР-амплификации. Этот подход основан на получении из вышеуказанных микроорганизмов неразрушенных клеточных оболочек, содержащих ДНК и частично РНК. Такие ДНК-содержащие препараты легко приготовить путем экстрагирования из клеток белков, липидов и других низкомолекулярных компонентов буферными растворами, содержащими соли-хаотропы. Как оказалось, клеточные оболочки с ДНК и РНК можно непосредственно использовать в ПЦР. Метод опробован нами на клетках более 10 видов дрожжей (см. таблицу), а также на мицелии нескольких видов грибов.

Штаммы дрожжей, использованные в работе, и их происхождение

Штамм дрожжей	Источник получения*, исполнитель
<i>Candida albicans</i> 2501	Природный изолят, КБП Y 2501, И.П. Бабьева (МГУ им. М.В. Ломоносова)
<i>C. tropicalis</i> 3445	Природный изолят, КБП Y 3445, И.П. Бабьева
<i>C. parapsilosis</i> 110	Природный изолят, КБП Y 110, И.П. Бабьева
<i>C. glabrata</i> 3537	Природный изолят, КБП Y 3537, И.П. Бабьева
<i>Cryptococcus huempii</i> 2637	Типовой штамм, ВКМ Y 2637, И.П. Бабьева
<i>Leucosporidium fasticulatum</i> 3696	Типовой штамм, ВКМ Y 3696, И.П. Бабьева
<i>L. follii</i> 2757	Типовой штамм, ВКМ Y 2757, И.П. Бабьева
<i>L. scottii</i> 2774	Типовой штамм, ВКМ Y 2774, И.П. Бабьева
<i>Mrakia curviuscula</i> sp.nov. 358	Типовой штамм, ВКМ Y 358, И.П. Бабьева
Независимые изоляты	Выделены из природы, И.П. Бабьева
<i>M. curviuscula</i>	
<i>M. frigida</i> 1445	Типовой штамм, ВКМ Y 1455, И.П. Бабьева
<i>Pichia pastoris</i> GS115	Лабораторный штамм, (ИБХ РАН) Л.Е. Петровская
Производные	Трансформанты штамма GS115, Л.Е. Петровская
<i>P. pastoris</i> GS115	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Лабораторный штамм, Г.В. Шпаковский
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h ⁻	Лабораторный штамм, Г.В. Шпаковский

* КБП Y – коллекция дрожжей кафедры биологии почв МГУ им. М.В. Ломоносова; ВКМ Y – коллекция дрожжей Всероссийской коллекции микроорганизмов, Москва.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Важнейшее свойство солей-хаотропов – их способность денатурировать белки. Так, в присутствии 4 М хлорида и тиоцианата гуанидиния происходит быстрая денатурация всех клеточных белков, в том числе нуклеаз [13–17]. При 20°C время инактивации (τ 1/2) РНКазы А, одного из наиболее термостабильных белков, составляет всего 10 с для 4 М Gu · HCl [13] и 4 с для 4 М Gu · HSCN [14, 15].

Другое важнейшее свойство солей-хаотропов – их способность солюбилизировать липидные мембранны. В присутствии солей гуанидиния происходит разрушение цитоплазматической мембранны клеток, всех клеточных органелл и структур – митохондрий, ядра и хромосом, рибосом и других рибонуклеопротеидов, распадаются комплексы ДНК с гистонами и другими белками и конденсированная хромосомная ДНК переходит в свободную форму.

Соли-хаотропы также способны ослаблять водородные связи и понижать температуру плавления ДНК.

Вышеперечисленные свойства солей гуанидиния определили их применение при выделении РНК [18] и ДНК [19–21] из клеток животного происхождения, а также из клеток грамотрицательных микроорганизмов. Что касается многих грамположительных бактерий, а также дрожжей и грибов, то клеточные оболочки этих организмов не разрушаются даже при кипячении в присутствии 4 М гуанидинийтиоцианата (наши данные).

Мы установили, что обработка клеток дрожжей и грибного мицелия буферными растворами, содержащими соли-хаотропы, в широком интервале температур (от 20 до 100°C) приводит к пермебилизации их клеточных оболочек. Этот процесс, вероятно, связан с образованием (открыванием) в полисахаридных оболочках клеток пор достаточно большого размера. Клеточные оболочки при этом сохраняют свою форму и целостность (это следует из данных микроскопического анализа), однако через образующиеся поры происходит экстракция внутриклеточного содержимого – белков, липидов, олигосахаридов и всех низкомолекулярных компонентов. В значительной степени экстрагируется также РНК. Геномная ДНК по причине своей большой длины не проникает через поры и остается внутри клеточных оболочек.

Если обработку клеток солями-хаотропами проводить в температурном диапазоне от 20 до 40°C (т.е. ниже температуры плавления ДНК в буфере с хаотропами) в течение нескольких часов, то можно получить клеточные оболочки дрожжей и грамположительных бактерий с интактной геномной ДНК (неопубликованные данные авторов).

Если же такую обработку осуществлять при 100°C, то экстракция растворимых компонентов

(белков, липидов и т.д.) завершается в течение нескольких минут. Очевидно, что при таком температурном режиме обработки хромосомная ДНК денатурирует и частично фрагментируется. Интересно, что при этом лишь незначительная часть денатурированной ДНК экстрагируется из клеток, основная же ее часть остается внутри клеточных оболочек.

Мы анализировали нуклеиновые кислоты (НК) в экстрактах, полученных после кипячения клеток *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* в течение 3 и 5 мин в буфере D с 4 М гуанидинийтиоцианатом. Показано, что хромосомная ДНК из свежевыросших клеток анализируемых дрожжей в данных условиях опыта не экстрагируется вообще. В тех же условиях обработка небольшая часть хромосомной ДНК (по нашим оценкам, около 3%) переходит в раствор, если биомасса дрожжей хранилась более двух недель при +4°C. В обоих случаях в супернатанте после осаждения клеток присутствует значительное количество РНК. Сходные результаты были получены при кипячении клеток дрожжей в буфере D-2 и Е в течение того же времени. Количество ДНК, экстрагированной из клеток, как мы выяснили, зависит от времени кипячения на водяной бане и в меньшей степени от состава буфера. Так, при кипячении клеток дрожжей *P. pastoris* и мицелия трех видов грибов в течение 7 мин в буферах с гуанидинийтиоцианатом (D и D-2, см. “Эксперимент. часть”), а также с гуанидинийхлоридом (буфер Е), хромосомная ДНК в незначительном количестве (менее 3%) была выявлена в супернатантах анализируемых объектов.

В последующей работе при получении клеточных оболочек, содержащих ДНК, с целью их прямого использования в ПЦР, обработку клеток солями-хаотропами проводили на кипящей водяной бане в течение 5 мин, кроме специально оговоренных случаев (стандартная методика).

Мы также изучили состав белков, экстрагируемых в этих условиях из дрожжевых клеток солями-хаотропами. С этой целью клетки *P. pastoris* и *S. cerevisiae* инкубировали в буфере D, содержащем β-меркаптоэтанол, на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После осаждения клеточных оболочек центрифугированием, полученные экстракты диализовали против дистиллированной воды и использовали для анализа белкового состава методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. В контрольном опыте экстракцию белков *P. pastoris* и *S. cerevisiae* осуществляли стандартным способом – после разрушения клеток стеклянными шариками [7]. Из результатов проведенных экспериментов следовало, что при данных условиях обработки дрожжевых клеток (4 М гуанидинийтиоцианат в присутствии β-меркаптоэтанола), происходит экстракция всех kle-

точных белков, в том числе и белков с высокой молекулярной массой (результаты не представлены).

Данный способ экстракции суммарных белков, не требующий разрушения клеток, мы полагаем, может найти применение при изучении белковых профилей различных грибов, а также при изучении гетерологичной экспрессии генов, клонированных в дрожжах.

Таким образом, полученные экстракцией солями гуанидиния в оптимальных условиях (100°C , 5 мин) клеточные оболочки содержат практически всю ДНК (свыше 97%) и значительную часть РНК (около 50%). Такие клеточные оболочки с ДНК и РНК, как оказалось, проницаемы для ДНКаз и РНКаз. Так, при добавлении к суспензии клеточных оболочек *S. cerevisiae* и *P. pastoris* в буфере с 10 mM Трис-НСl и 1 mM EDTA раствора РНКазы А до конечной концентрации 200 мкг/мл и последующем инкубировании суспензии в течение 30 мин при 37°C , удается расщепить всю РНК и получить клеточные оболочки, содержащие только лишь ДНК. Низкомолекулярные продукты расщепления РНК при этом переходят в раствор (супернатант) и могут быть полностью удалены путем промывки клеточных оболочек дистиллированной водой.

Аналогичным образом, если к суспензии НК-содержащих клеточных оболочек в соответствующем буфере добавить микрококковую нуклеазу, то с ее помощью можно разрушить всю РНК и ДНК. При последующей 3–4-кратной промывке осадка дистиллированной водой можно получить пустые клеточные оболочки, полностью лишенные нукleinовых кислот.

Тот факт, что получаемые нами клеточные оболочки с ДНК и РНК проницаемы для ДНКаз и РНКаз, подтверждает наличие в клеточных оболочках пор достаточно большого размера. Логично было бы предположить, что через эти поры внутрь клеточных оболочек могут диффундировать также и ДНК-полимеразы (в частности, *Taq*-полимераза), не говоря уже об олигонуклеотидных праймерах и дезоксинуклеозидтрифосфатах. Другими словами, не исключено, что внутри клеточных оболочек может осуществляться ПЦР.

Для изучения вопроса, каким образом хромосомная ДНК, находящаяся внутри полисахаридных сфер, служит матрицей в ПЦР, мы изучили свойства НК-содержащих клеточных оболочек, в частности их способность удерживать ДНК и РНК при различных температурных режимах. Мы установили, что в условиях хранения при 4°C НК-содержащие клеточные оболочки достаточно прочно удерживают ДНК и менее прочно РНК.

В эксперименте суспензии клеточных оболочек *S. cerevisiae* и *P. pastoris* хранили при 4°C в течение 2 месяцев. Затем суспензии центрифугировали и исследовали ДНК и РНК в супернатантах.

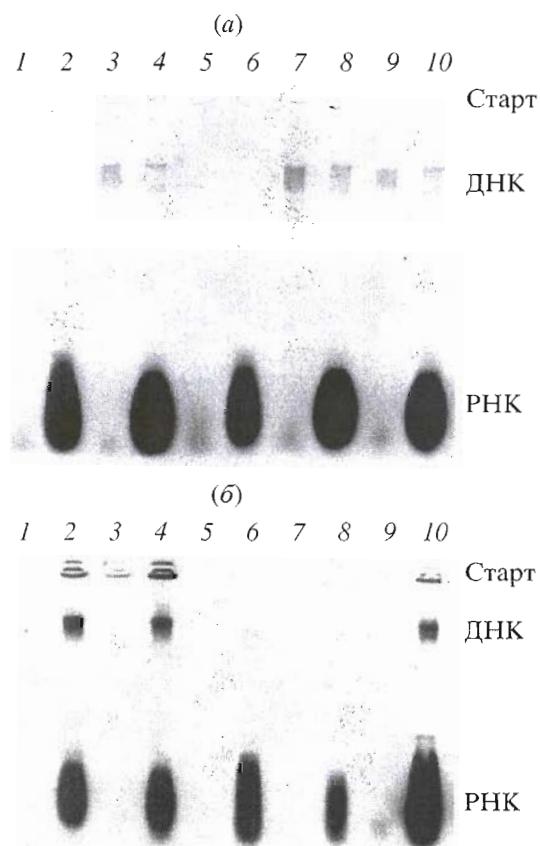


Рис. 1. Электрофоретический анализ образцов супернатанта после осаждения НК-содержащих клеточных оболочек дрожжей, хранившихся при 4°C (a) и при -20°C (b). a) – оболочки *S. cerevisiae* и *P. pastoris* – до прогрева их водной суспензии при 93°C в течение 5 мин (1, 2); после прогрева (3, 4); после замораживания (-70°C) и оттаивания (5, 6); после повторного прогрева при 93°C в течение 5 мин (7, 8); после замораживания (-70°C) и последующего прогрева (9, 10). b) – оболочки *Cr. huempii* (1, 2); *M. curviuscula* sp. nov. (3, 4); *L. follii* (5, 6); *L. scottii* (7, 8); *M. frigida* (9, 10) – до (нечетные цифры) и после прогрева (четные).

Как оказалось, через поры клеточных оболочек *S. cerevisiae* практически вся РНК диффундировала в раствор. Что же касается ДНК, то ее в супернатанте *S. cerevisiae* зарегистрировано не было. В то же время в супернатанте от клеточных оболочек *P. pastoris*, наряду с РНК, было обнаружено также небольшое количество ДНК, соответствующая полоса отчетливо просматривалась на электрофорограмме (данные не представлены). Однако интересным оказалось то, что при кратковременном прогреве водной суспензии клеточных оболочек (93°C , 5 мин) (т.е. при температуре выше точки плавления ДНК) происходит выход значительной части хромосомной ДНК (равно как и РНК) в раствор (рис. 1a). Как видно из представленной электрофорограммы, вышедшая из клеточных оболочек в раствор ДНК образует диффузную

полосу, т.е. представляет собой статистическую смесь денатурированных молекул, размеры которых варьируют в достаточно широких пределах – по нашим оценкам от 15 до 25 т.п.о. Спектр молекулярных масс фрагментов ДНК, очевидно, определяется временем инкубирования супензии клеток на кипящей водяной бане в буфере с хаотропами. Повторный прогрев супензии клеточных оболочек в тех же условиях приводит к еще большему выходу ДНК в раствор (рис. 1а, дорожки 7, 8). А при трехкратном прогреве супензии клеточных оболочек *S. cerevisiae* и *P. pastoris* в раствор переходит практически вся ДНК и РНК (данные спектрофотометрического определения НК в супернатантах).

Мы сняли спектры УФ-поглощения таких НК, вышедших из клеточных оболочек двух видов дрожжей после прогрева (93°C, 15 мин) и показали, что они имеют вид, характерный для высокочищенных препаратов НК, получаемых с помощью классических методов, например, с помощью фенол-хлороформенной депротеинизации (отношение A_{260}/A_{280} у анализируемых образцов составляло 1.85–1.90).

Аликвоты супернатантов, полученных после прогрева клеточных оболочек *S. cerevisiae* и *P. pastoris* при 93°C в течение 15 мин, содержащие только ДНК и РНК, были добавлены в реакционную смесь для ПЦР, содержащую один из универсальных праймеров (№ 21, № 45 и № 15/19 [22]). Результаты УП-ПЦР были идентичны таковым контрольного эксперимента, в котором использовали хромосомную ДНК, выделенную с помощью стеклянных шариков из клеток тех же дрожжей. (УП-ПЦР-паттерны дрожжей см. ниже.)

Мы исследовали также термоиндуцируемый выход ДНК из клеточных оболочек других видов дрожжей, хранившихся при –20°C, а также из клеточных оболочек мицелиальных грибов. Полученные данные (рис. 1б) свидетельствуют о том, что дрожжи разных видов сильно различаются по способности их клеточных оболочек удерживать ДНК в условиях прогрева при 93°C. Однако, как показал наш опыт, эти отличия в свойствах клеточных оболочек практически не сказываются на конечном выходе фрагментов ДНК – продуктов ПЦР-амплификации.

Что же касается исследованных нами грибов, то нам не удалось зарегистрировать методом электрофореза выход ДНК из состава их мицелиальных оболочек в раствор даже при прогреве их супензий в течение 10 мин. По данным спектрометрии, выход РНК в раствор в этом случае также был сильно замедлен по сравнению с *S. cerevisiae* и *P. pastoris*. Сказанное справедливо как в отношении жестких мицелиальных оболочек несовершенных грибов рода *Acremonium*, так и в отноше-

нии мягких мицелиальных оболочек совершенных грибов шампиньонов (данные не представлены).

С учетом вышеприведенных фактов мы можем нарисовать следующую картину событий, объясняющую каким образом геномная ДНК, заключенная внутри полисахаридных клеточных оболочек, служит матрицей в ПЦР. После кратковременной инкубации дрожжевых клеток в буфере с хаотропами на кипящей водяной бане и при последующем быстром охлаждении смеси до комнатной температуры, фрагменты хромосомной ДНК вместе с РНК за счет комплементарных взаимодействий образуют внутри клеточных оболочек трехмерную сеть, т.е. комплекс, нерастворимый при комнатной температуре. Образование нерастворимой трехмерной сети из денатурированной ДНК, РНК и белков в процессе быстрой нейтрализации щелочного лизата клеток грамотрицательных бактерий ацетатом калия/натрия было постулировано ранее Бирнбоймом и Доли [23]. При последующей промывке супензии клеточных оболочек дистиллированной водой ДНК из таких комплексов практически не вымывается, в то же время происходит практически полное удаление остатков денатурированных белков, некоторой части РНК и водорастворимых низкомолекулярных компонентов. Если далее супензию клеточных оболочек добавить в реакционную смесь для ПЦР, то уже в самом начале процедуры ПЦР (прогрев пробирок с реакционной смесью при 93°C в течение 2–3 мин) трехмерный комплекс ДНК + РНК диссоциирует и денатурированная ДНК из клеточных оболочек диффундирует в раствор, где собственно и служит матрицей в ПЦР. Мы не исключаем и того, что ПЦР может также идти, хоть и не столь эффективно, и внутри клеточных оболочек. Образовавшиеся при этом низкомолекулярные продукты ПЦР, с облегченной способностью к диффузии, быстро переходят в раствор, где и участвуют в последующих раундах амплификации. Этим можно было бы объяснить образование фрагментов ДНК в ходе ПЦР с ДНК-содержащими мицелиальными оболочками грибов.

Таким образом, ПЦР с участием НК-содержащих клеточных оболочек дрожжей ничем не отличается от ПЦР, где матрицей служит очищенная ДНК.

Из других свойств ДНК-содержащих клеточных оболочек дрожжей и грибов следует отметить их различную устойчивость к замораживанию и оттаиванию. Мы обнаружили, что замораживание водной супензии клеточных оболочек одних видов дрожжей (например, *P. pastoris*, *Cr. huentii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*) и их последующее оттаивание приводят к повреждению клеточных оболочек (изменению их свойств). Это выражается в том, что после замораживания уже не удается получить гомогенную

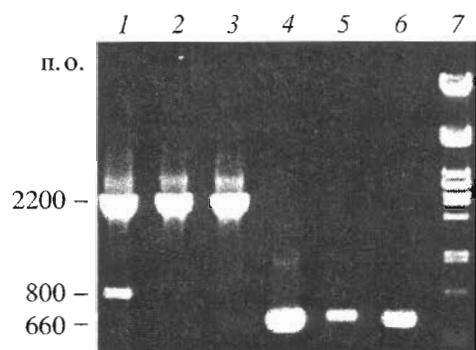


Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР-амплификации фрагмента ДНК *P. pastoris*, кодирующего ген алкогольоксидазы *aox1* (2200 п.о.) и фрагмента ДНК (800 п.о.), встроенного вместо гена *aox1* (1–3), а также фрагмента ДНК *Sch. pombe* (660 п.о.), кодирующего субъединицу *Rpc19* РНК-полимераз I и III (ген *rpc19⁺*) (4–6). В качестве матрицы использовали клеточные оболочки с ДНК *P. pastoris* (1, 2) и *Sch. pombe* (4, 5), а также хромосомную ДНК *P. pastoris* (3) и *Sch. pombe* (6). Дорожка 7 – *PstI*-рестриктины ДНК фага λ .

сусpenзию – клеточные оболочки слипаются и образуют полупрозрачные агрегаты (хлопья). Это затрудняет взятие аликвот на ПЦР. Клеточные оболочки других видов дрожжей (*S. cerevisiae*, *Sch. pombe*, *C. albicans*, *L. foltii*, *L. scottii*, *L. fasticulatum*, *M. frigida* и большинства изолятов *M. curviuscula*) достаточно прочны и образуют гомогенную сусpenзию даже при многократных циклах замораживания-оттаивания. Что же касается мицелиальных оболочек грибов *Agaricus bisporus*, то при замораживании и последующем оттаивании соответствующей водной сусpenзии они образуют нерастворимый комок (сгусток), который не поддается суспендированию (гомогенизации). Мицелиальные оболочки *Acremonium turrorum* и *Acr. strictum* при замораживании и оттаивании, напротив, не изменяют своих свойств. С учетом этих данных мы рекомендуем не замораживать сусpenзии клеточных оболочек дрожжей и мицелиальных оболочек грибов. Их можно достаточно длительное время хранить при 4°C.

Ниже приведены примеры использования ДНК-содержащих клеточных оболочек дрожжей и мицелиальных грибов в ПЦР.

На рис. 2 представлены результаты ПЦР-амплификации гена алкогольоксидазы (гена *aox1*) *P. pastoris GS115* [24] и одного из его производных, а также гена *rpc19⁺* *Sch. pombe* 972h⁺ [25], полученные с использованием генспецифических праймеров и ДНК-содержащих клеточных оболочек. Как видно из этого рисунка, в ходе ПЦР на клеточных оболочках образуются фрагменты ДНК того же размера, что и в контроле, когда в качестве матрицы была взята хромосомная ДНК, выделенная с использованием стеклянных шариков

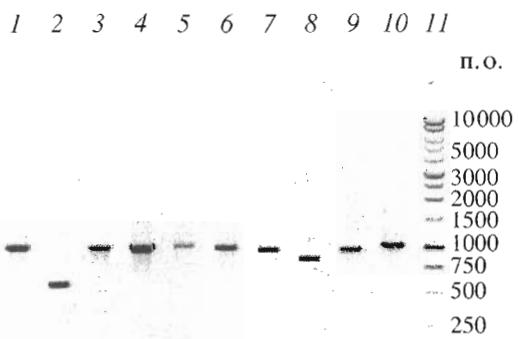


Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР-амплификации (30 термальных циклов) фрагмента рибосомной ДНК у различных видов дрожжей с помощью праймеров 5,8S-R и LR3 [26]. В качестве матрицы использованы ДНК-содержащие клеточные оболочки *S. cerevisiae* (1); *P. pastoris* (2); *L. fasticulatum* (3); *L. foltii* (4); *L. scottii* (5); *M. frigida* (6); *C. albicans* (7); *C. tropicalis* (8); *C. parapsilosis* (9); *C. glabrata* (10). Маркеры длин фрагментов ДНК (11).

ков (ср. дорожки 1, 2 и 3, а также 4, 5 и 6). Принимая во внимание легкость и простоту получения клеточных оболочек *P. pastoris*, *Sch. pombe*, а также *S. cerevisiae* (см. раздел “Эксперимент. часть”), совершенно очевидно, что предлагаемый нами метод может сильно упростить и удешевить работу по скринингу колоний трансформантов в экспериментах по клонированию чужеродных генов в этих дрожжах.

В другом опыте (см. рис. 3) ДНК-содержащие клеточные оболочки 10 видов дрожжей, принадлежащих к различным далеко отстоящим друг от друга родам (полученные по стандартной методике), были использованы для ПЦР-амплификации фрагмента рибосомной ДНК (рДНК) с праймерами 5,8S-R и LR3 к консервативным участкам рДНК [26]. В присутствии этих праймеров и соответствующей матричной ДНК происходит амплификация межгенового участка (спайсера) ITS2 и области D1/D2 26S субъединицы рДНК. Изучение тонкой структуры фрагментов рДНК – продуктов ПЦР (например, с помощью рестриктного анализа или секвенирования) используется в геносистематике грибов [26].

Как видно из рис. 3, в большинстве случаев в ходе ПЦР после 30 термальных циклов образуются фрагменты ДНК, размером около 900 п.о., что хорошо совпадает с литературными данными [26]. Исключением явились *P. pastoris* (дорожка 2) и *C. tropicalis* (дорожка 8), у которых продукты ПЦР оказались значительно меньше по размеру – около 500 и 750 п.о., соответственно (у этих дрожжей соответствующие области геномной ДНК еще не секвенированы). В независимом опыте с мицелиальными оболочками трех видов грибов и

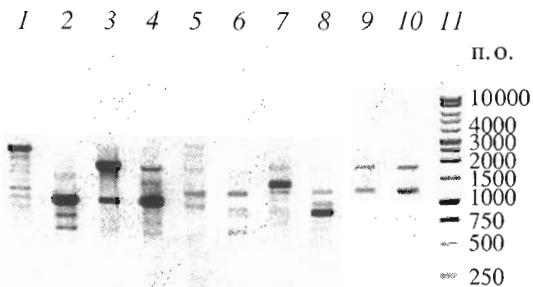


Рис. 4. Электрофоретический анализ фрагментов ДНК – продуктов УП-ПЦР, полученных с использованием универсального праймера № 45 [22] и ДНК-содержащих клеточных оболочек *S. cerevisiae* (1); *P. pastoris* (2); *L. follii* (3); *L. scottii* (4); *M. frigida* (5); *L. fasticulatum* (6); *C. albicans* (7); *C. tropicalis* (8); *C. parapsilosis* (9); *C. glabrata* (10). Маркеры длин фрагментов ДНК (11).

той же парой праймеров также были получены фрагменты рибосомной ДНК размером около 900 п.о. (данные не представлены). Поскольку денатурированная геномная ДНК из состава мицелиальных оболочек грибов при 93°C диффундирует в раствор с низкой эффективностью, число циклов ПЦР в данном опыте мы увеличили до 32. При таком числе термальных циклов интенсивности полос ДНК – продуктов ПЦР, на электрофорограмме были такими же, как и в случае ПЦР с клеточными оболочками дрожжей.

Недавно Л.Е. Петровской (ИБХ РАН) были получены ПЦР-фрагменты ITS2 + D1/D2 из более чем 10 видов дрожжей, принадлежащих к родам *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* и *Pichia*. Во всех случаях ПЦР проводили с ДНК-содержащими клеточными оболочками, т.е. используя разработанный нами метод. Последующее секвенирование участка D2 у полученных ПЦР-фрагментов позволило сделать вывод о видовой принадлежности исследуемых дрожжей (неопубликованные данные).

Здесь нужно отметить, что используя метод интенсивного встраивания со стеклянными шарики и буфер D с 4 М гуанидинийтиоцианатом в сочетании с 3-кратным замораживанием (-70°C) и оттаиванием, мы не смогли выделить хромосомную ДНК из дрожжей родов *Candida*, *Makia*, *Leucosporidium* и *Cryptococcus*. Удовлетворительные выходы ДНК при такой методике были получены лишь в случае лабораторных штаммов *P. pastoris*, *S. cerevisiae* и *Sch. pombe*. В то же время разработанный нами метод работает и в случае упомянутых дрожжевых штаммов, выделенных из природных источников, с жесткой клеточной стенкой.

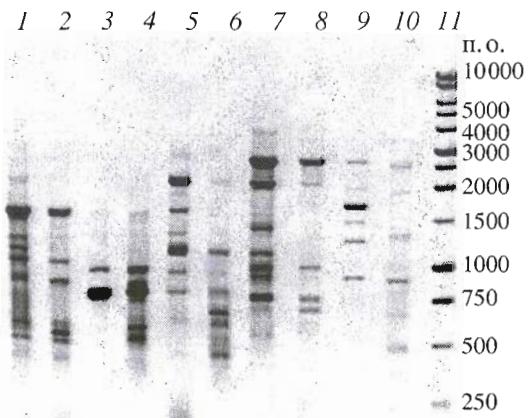
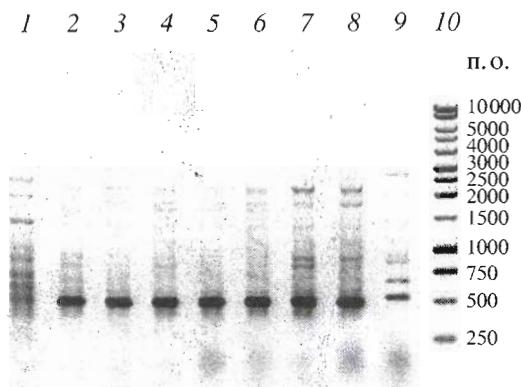


Рис. 5. Электрофоретический анализ фрагментов ДНК – продуктов УП-ПЦР, полученных с универсальными праймерами № 15/9 [22] (дорожки 1–6) и № 45 (дорожки 7–10). В качестве матрицы взяты: хромосомная ДНК *A. bisporus* (1, 7); мицелиальные оболочки *A. bisporus* (2, 8); хромосомная ДНК *Acr. miogorum* (3); мицелиальные оболочки *Acr. miogorum* (4, 9); мицелиальные оболочки *Acr. strictum*, 4-суточный (5, 10) и 7-суточный (6) мицелий. Маркеры длин фрагментов ДНК (11).

В последние годы для изучения геносистематики дрожжей и грибов находит широкое применение техника УП-ПЦР – ПЦР с использованием универсальных праймеров [4, 22]. По существу УП-ПЦР, как и АП-ПЦР [3], РАПД-ПЦР [2], это разновидность ПЦР, при которой в качестве праймеров используются такие олигонуклеотиды, которые обладают способностью отжигаться во многих местах геномной ДНК и инициировать синтез ДНК. Основным свойством амплифицированных с этих праймеров фрагментов ДНК является видоспецифичность, т.е. сходство ПЦР-паттернов организмов в пределах биологического вида [4, 22]. Таким образом, техника УП-ПЦР пригодна для детального сравнительного анализа геномов дрожжей и грибов [4, 22].

Используя три универсальных праймера – № 21, № 45 и № 15/19 и ДНК-содержащие клеточные оболочки в качестве матрицы, мы получили УП-ПЦР-паттерны для 10 видов дрожжей (рис. 4) и трех видов мицелиальных грибов (рис. 5). Из полученных данных следует, что для каждого из исследованных образцов распределение отдельных полос на электрофорограмме и их интенсивности являются уникальными, т.е. полученные УП-ПЦР-паттерны действительно отражают строение геномов соответствующих организмов.

Хотелось бы отметить хорошую воспроизведимость результатов УП-ПЦР. У независимо полученных образцов клеточных оболочек дрожжей одного вида наблюдались лишь вариации в интенсивности отдельных полос. В контрольных экспериментах с хромосомной ДНК отдельных видов дрожжей, выделенной с применением стек-

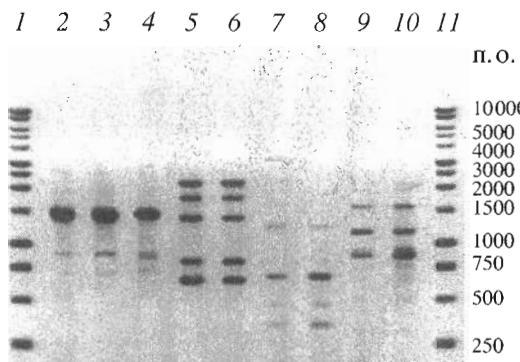


лянных шариков, были получены идентичные или сходные УП-ПЦР-паттерны. Нужно особо подчеркнуть, что для получения сравнимых результатов образцы хромосомной ДНК для УП-ПЦР (равно как и для РАПД-ПЦР) необходимо денатурировать кипячением на водяной бане в течение 3–5 мин.

Используя технику УП-ПЦР на ДНК-содержащих клеточных оболочках, мы исследовали гены семи независимых дрожжевых изолятов, выделенных из природных источников, и сравнили их с геномами типовых штаммов *Cr. huemeri* и *M. frigida*, наиболее близких к изучаемым по морфологическим, физиологико-биохимическим и другим признакам (рис. 6). В этом случае в УП-ПЦР использовали праймер № 21. Как видно из рис. 6, родство геномов семи анализируемых изолятов не вызывает сомнения.

Клеточные оболочки с ДНК для четырех видов дрожжей *P. pastoris*, *S. cerevisiae*, а также *Cr. huemeri* и *M. curviuscula* были использованы также в ПЦР с декануклеотидными праймерами (техника РАПД-ПЦР [2]). Распределение фрагментов ДНК – продуктов ПЦР-амплификации и в этом случае является уникальным для каждого из исследованных образцов (рис. 7). Нужно отметить, что в контрольном эксперименте с дрожжевой хромосомной ДНК в качестве матрицы для ПЦР, были получены идентичные картины. Хотелось бы также подчеркнуть, что полученные нами РАПД-ПЦР-паттерны во всех случаях отличались высокой воспроизводимостью и не зависели от состава экстракционного буфера, использованного для получения клеточных оболочек.

Мы определили также чувствительность ПЦР с ДНК-содержащими клеточными оболочками. С этой целью делали серийные разведения (10^{-1} ,



10⁻²...10⁻⁷) супензий ДНК-содержащих клеточных оболочек (исходный титр дрожжевых клеток перед обработкой солями-хаотропами составлял 5 × 10⁸–1 × 10⁹). В опыт были взяты шесть штаммов дрожжей, клеточные оболочки которых не агрегировали в результате нескольких циклов замораживания-оттаивания. При этом клеточные оболочки четырех штаммов (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *M. curviuscula*, *M. frigida*) легко отдавали свою ДНК в раствор при 93°C (см. рис. 1а и б). Клеточные оболочки двух других штаммов (*L. follii* и *L. scottii*) прочно удерживали геномную ДНК в процессе прогрева при 93°C (рис. 1б, дорожки 6, 8). По 1 мкл раствора из каждого разведения вносили в реакционную смесь для ПЦР, содержащую праймеры LR3 и 5,8S-R. Число циклов ПЦР варьировало от 30 до 45 в зависимости от разведения исходной супензии. Режим ПЦР указан в разделе “Эксперимент. часть”.

Как оказалось, фрагменты ДНК – продукты ПЦР были получены из всех разведений, за исключением 10⁻⁷. По своему размеру они точно соответствовали ожидаемым фрагментам рДНК (иллюстрации не приведены). Интенсивность соответствующих полос на электрофорограмме лишь слегка уменьшалась по мере разведения супензии. Интересно, что различия в способности клеточных оболочек удерживать ДНК при 93°C совершенно не сказывались на результатах ПЦР.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что каждая клеточная оболочка с ДНК может служить матрицей в ПЦР. Иными словами, чувствительность метода “ПЦР на

ДНК-содержащих клеточных оболочках" такая же, как и в случае ПЦР с очищенной ДНК.

Таким образом, разработанный нами метод получения матриц для ПЦР может найти применение в ПЦР-диагностике и в таксономических исследованиях.

В отличие от традиционных методов, используемый нами подход отличается простотой исполнения, занимает предельно мало времени (вся процедура подготовки одного образца для ПЦР занимает около 20–25 мин), позволяет обрабатывать одновременно несколько десятков образцов.

В литературе последнего десятилетия описаны и другие простые и быстрые способы (методы) приготовления дрожжевых матриц для ПЦР. Так, для скрининга дрожжевых колоний на наличие тех или иных плазмидных, митохондриальных или хромосомных последовательностей (или клонируемых генов) предлагается использовать в ПЦР необработанные клетки дрожжей или (что более эффективно) клетки, обработанные щелочью, растворами детергентов (SDS) или зимилиазой [27–33]. Полученные клеточные супензии добавляют в реакционную смесь для ПЦР без предварительной очистки.

Действительно, при обработке лабораторных штаммов дрожжей (*P. pastoris*, *S. cerevisiae*, *Sch. pombe* и др.) вышеуказанными агентами и при последующем прогреве клеток при 93–95°C (стадия денатурации в ПЦР) происходит разрушение некоторой части клеток и ДНК выходит в раствор, где она служит матрицей при синтезе ДНК. К сожалению, вышеуказанные экспресс-методы, как правило, не работают или плохо работают на диких штаммах дрожжей и мицелиальных грибов, у которых очень жесткая клеточная оболочка. Кроме того, для постановки некоторых вариантов ПЦР (УП-ПЦР, РАПД-ПЦР) нужна очищенная геномная ДНК (это важное условие для получения воспроизводимых результатов).

Отличительная особенность нашего метода состоит в том, что он позволяет получать **высокоочищенную** геномную ДНК в составе **инертных** клеточных оболочек. В ходе экстракции солями-хаотропами выход такой ДНК достигает 100%. Иными словами, 100% дрожжевых клеток превращаются в клеточные оболочки с чистой депротеинизированной ДНК. Нужно отметить, что интактные клеточные оболочки дрожжей, содержащие НК, получены нами впервые. Получаемые нами ДНК-содержащие клеточные оболочки – это, по сути, препараты высокоочищенной геномной ДНК, которые способны длительное время храниться как в замороженном состоянии, так и при температуре выше 0°C. Денатурированная ДНК в составе клеточных оболочек может быть использована не только в ПЦР, но и, например, для ДНК-ДНК-гибридизации, а белоксодер-

жащие клеточные экстракти (супернатанты) в принципе можно использовать для анализа белковых профилей у дрожжей и грибов (доказательство пригодности метода для анализа белковых профилей – предмет отдельного исследования).

Предложенный метод получения ДНК-содержащих клеточных оболочек, похоже, является универсальным – все изученные нами и нашими коллегами в других лабораториях виды дрожжей и мицелиальных грибов в присутствии солей гуанидиния при 100°C образуют целевой продукт. Мы предполагаем, что этот метод сможет работать и на широком круге других объектов, в том числе и на грамположительных бактериях, стрептомицетах и других микроорганизмах с прочной клеточной стенкой. Значительный интерес представляют также сами клеточные оболочки (cell envelope core), их структуру и свойства еще предстоит изучить.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. Гуанидинийгидрохлорид, гуанидинитиоцианат (Fluka), сарказил (лауроилсарказил, Na-соль) (ICN Biomedicals), компоненты питательных сред (Difco), РНКаза А (Sigma), микрококковая нуклеаза (Millipore Co.). Маркеры молекулярных масс фрагментов ДНК – т.п.о. ДНК (Fermentas). Остальные реагенты – фирмы Sigma.

Штаммы дрожжей, использованные в работе, приведены в таблице.

Клетки дрожжей выращивали в жидкой среде YPD (1.0% дрожжевой экстракт, 2.0% бактопептон, 2.0% глюкоза, pH 5.3) или на чашках с агаризованной средой YPD (1.5% агар) при 30°C.

Грибной мицелий. Два вида несовершенных грибов (*Fungi imperfecti*) *Acremonium turorum* (*Colora*) и *Acr. strictum* были предоставлены К.Л. Тарасовым (МГУ им. М.В. Ломоносова). Культивируемые грибы шампиньоны *A. bisporus* покупали на местном рынке.

Мицелий несовершенных грибов выращивали на чашках с агаризованной средой YPD (на этой среде грибы не спорулируют). Чашки инкубировали при 29°C в течение 5–7 сут. Для получения биомассы с помощью стерильного скальпеля снимали верхний слой агара с проросшим вглубь мицелием.

Буферные растворы с солями-хаотропами: буфер D (4 М гуанидинитиоцианат, 25 mM цитрат натрия, pH 7.0, 0.1 M β-меркаптоэтанол, 0.5% сарказил [18], D-2 (4 М гуанидинитиоцианат, 50 mM Трис-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.1 M β-меркаптоэтанол, 0.5% сарказил). Обработку клеток и мицелия проводили также буфером E (6 М гуанидинийхлорид, 30 mM Трис-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.1 M β-меркаптоэтанол, 0.5% сарказил).

Получение ДНК-содержащих клеточных оболочек (стандартная методика*). Клетки дрожжей (25–30 мг сырой биомассы) суспендировали в 200 мкл буфера D, D-2 или E и инкубировали на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Клетки осаждали центрифугированием при 12000 об/мин в течение 60 с на центрифуге Eppendorf. Супернатант выбрасывали. Клеточный осадок дважды промывали в 1 мл дистиллированной (деионизованной) воды и суспендировали в 200 мкл стерильной дистиллированной воды или TE-буфера (5 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 1 мМ EDTA). Суспензию клеточных оболочек, содержащих ДНК и РНК (РНК), хранили при 4°C или при –20°C.

В аналитическом (микро) варианте (ПЦР на колониях трансформантов *P. pastoris* или *S. cerevisiae*) отдельную колонию (часть колонии), образующую видимый для глаза осадок при центрифугировании, суспендировали в 50 мкл буфера для экстракции. После прогрева на водяной бане в течение 5 мин клеточные оболочки промывали дважды в 200 мкл дистиллированной воды, а затем суспендировали в 10 мкл дистиллированной воды или TE-буфера.

При работе с мицелием несовершенных грибов верхний слой агара (~1 см²) с проросшим вглубь мицелием переносили в стандартную центрифужную пробирку (Eppendorf) объемом 1.5 мл и суспендировали с помощью специально подогнанного одноразового пестика (Eppendorf) в 300 мкл буфера D до полного растворения агара. Полученную суспензию центрифугировали в течение 60 с при 12000 об/мин. Супернатант переносили в чистую пробирку и использовали для выделения части хромосомной ДНК, как описано ниже, а мицелиальный осадок суспендировали в 200 мкл свежего буфера D и обрабатывали в тех же условиях, что и дрожжевые клетки. После кипячения в течение 5 мин и двукратной промывки водой, мицелиальные оболочки с ДНК и РНК суспендировали в 200 мкл воды и хранили при 4°C, либо при –20°C.

При работе с мицелием грибов шампиньонов около 40 мг биомассы (материал брали независимо с ножки, шляпки или пластинок) переносили в 1.5 мл центрифужные пробирки и суспендировали с помощью пестика в 300 мкл буфера D. Условия обработки мицелия те же, что и в случае несовершенных грибов.

Выделение хромосомной ДНК из грибного мицелия. В ходе измельчения грибного мицелия, суспендированного в буфере с хаотропами в центрифужной пробирке с помощью пестика, мицелий частично разрушается и некоторая часть геномной ДНК переходит в раствор. Для выделения этой ДНК мицелий осаждали центрифугировани-

ем, а к супернатанту добавляли два объема 96% этанола и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ДНК промывали 70% этанолом, высушивали на воздухе и растворяли в 20 мкл стерильной воды. Полученную таким образом хромосомную ДНК использовали в качестве контроля в ПЦР-амплификации. Предварительно ее денатурировали нагреванием на кипящей водяной бане в течение 3 мин.

Анализ ДНК и РНК в экстрактах. После кипячения клеток дрожжей или грибного мицелия в соответствующем буфере для экстракции, полученную суспензию центрифугировали, как описано выше, а супернатанты осторожно отбирали и переносили в чистые пробирки. К супернатантам добавляли два объема 96% этанола, смесь центрифугировали в течение 10 мин, и осадки с ДНК и РНК растворяли в 50 мкл воды. На электрофорез в каждую лунку агарозного геля наносили по 10 мкл раствора.

Анализ ДНК и РНК в образцах НК-содержащих клеточных оболочек. Суспензии ДНК-содержащих клеточных оболочек *S. cerevisiae* и *P. pastoris* хранили в течение 2 месяцев при 4°C. Непосредственно перед опытом по 200 мкл суспензии каждого вида центрифугировали при 12 тыс. об/мин, супернатант переносили в чистую пробирку, а осадок (клеточные оболочки) суспендировали в 200 мкл дистиллированной воды и инкубировали 5 мин при 93°C и снова центрифугировали. Аликвоты супернатантов после первого и второго центрифугирования (по 10 мкл) наносили в лунки 1% агарозного геля и подвергали электрофорезу. В другом варианте суспензии ДНК-содержащих клеточных оболочек дрожжей перед опытом хранили две недели при –20°C. После оттаивания клеточные суспензии (по 200 мкл) центрифугировали и по 10 мкл супернатанта брали на форез, после чего осадок суспендировали, и смесь инкубировали 5 мин при 93°C. После повторного центрифугирования снова отбирали аликвоты супернатантов объемом 10 мкл и подвергали их электрофорезу.

ПЦР-амплификация с генспецифическими праймерами. Во всех случаях ПЦР проводили на термоциклире фирмы Perkin-Elmer-Cetus, модель 480. Реакционная смесь (50 мкл) содержала буфер для ПЦР (50 мМ KCl, 10 мМ Трис-HCl, pH 8.3, 1.5–2.0 мМ MgCl₂), смесь четырех dNTP (0,2 мМ каждый), праймерные олигонуклеотиды (10–15 пмоль каждого), 1–2 мкл суспензии ДНК-содержащих клеточных оболочек, либо 1–10 нг очищенной дрожжевой (грибной) ДНК и 2.5 ед.акт. термостабильной *Taq*-полимеразы (Eppendorf). В каждом ПЦР-эксперименте ставили отрицательный контроль – образец без матричной ДНК.

При амплификации гена *aox1* *P. pastoris*, а также чужеродных фрагментов ДНК, встроенных в

*Другие условия оговорены в каждом конкретном случае.

пределы гена *aox1*, использовали стандартные праймеры: (5')GACTGGTCCAATTGACAAGC и (5')GCAAATGGCATTCTGACATCC [24] (оба праймера предоставлены Л.Е. Петровской, ИБХ РАН).

Условия ПЦР: денатурация – 92°C, 30 с, отжиг – 55°C, 30 с, синтез – 72°C, 3 мин. Число циклов – 30.

При амплификации гена *rpc19⁺* *Sch. pombe* [25] использовали праймеры:

(5')CGGGATCCCACTTAGACATGGCGGC и (5')GGGAATTCTATAACCAATTATCCATC (праймеры предоставлены Г.В. Шпаковским, ИБХ РАН). Условия ПЦР те же, что и выше.

ПЦР-амплификацию фрагментов рибосомной ДНК у различных штаммов дрожжей проводили с помощью праймеров 5,8S-R: (5')TCGATGAA-GAACGCAAGC и LR3: (5')GGTCCGTGTTCAA-GAC [26] (эти праймеры также были предоставлены Л.Е. Петровской). Условия ПЦР: денатурация – 92°C, 50 с, отжиг – 55°C, 1 мин, синтез – 72°C, 1 мин. Число циклов – 30.

ПЦР с универсальными праймерами (УП-ПЦР) по методике [4]. Использовали три универсальные праймеры: № 21 (5')GGATCCGAGGGTGGCG-GTTCT; № 45 (5')GTAAAACGACGGCCAGT; № 15/19 (5')GAGGGTGGCGCTAG [22]. Универсальные праймеры были синтезированы Н.С. Быстровым (ИБХ РАН).

Условия ПЦР: денатурация – 92°C, 30 с, отжиг – 50°C, 30 с, синтез – 72°C, 1 мин. Число циклов – 30–35. Реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, праймеры добавляли в количестве 10 пмоль.

РАПД-ПЦР [2]. При постановке этой разновидности ПЦР в качестве праймеров были взяты олигонуклеотиды: (5')CGGCCCGGT (QR4) и (5')CGGCCCTGT (QR3) [2], предоставленные Л.И. Патрушевым (ИБХ РАН). В реакционную смесь (25 мкл) брали по 20 пмоль одного из праймеров и по 1 мкл супензии клеточных оболочек. Условия ПЦР: денатурация – 92°C, 1 мин, отжиг – 37°C, 1 мин, синтез – 72°C, 1 мин. Число циклов составляло 35.

Продукты ПЦР и другие НК-содержащие растворы анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле. Использовали стандартный Трис-ацетатный буфер с бромистым этидием [34].

Электрофорез белков проводили по методу Лэммли [35].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Г.В. Шпаковскому, Л.Е. Петровской и Л.И. Патрушеву за предоставленные лабораторные штаммы дрожжей и олигонуклеотидные праймеры, Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидных праймеров, И.П. Бабьевой и Г.А. Лисичкиной за предоставленные дикие и типовые штаммы дрожжей, Л.Е. Пе-

терсу за препарат *Taq*-полимеразы, В.Г. Коробко за критические замечания, сделанные при чтении рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. // Science. 1988. V. 239. P. 487–491.
2. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 6531–6535.
3. Welsh J., McClelland M. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 7213–7235.
4. Булат С.А., Кабоев О.К., Мироненко Н.В., Ибатуллин Ф.М., Лучкина Л.А., Суслов А.В. // Генетика. 1992. Т. 28. С. 20–28.
5. Glee P.M., Russell P.J., Welsch J.A., Pratt J.C., Cutler J.E. // Anal. Biochem. 1987. V. 164. P. 207–213.
6. van Burik J.-A.H., Schreckhise R.W., White T.C., Bowden R.A., Myerson D. // Medical Mycology. 1998. V. 36. P. 299–303.
7. Hoffman C.S., Winston F. // Gene. 1987. V. 57. P. 267–272.
8. Muller F.M., Werner K.E., Kasai M., Francescon A., Chanock S.J., Walsh T.J. // J. Clin. Microbiol. 1998. V. 36. P. 1625–1629.
9. Holm C., Meeks-Wagner D.W., Fangman W.L., Botstein D. // Gene. 1986. V. 42. P. 169–173.
10. Mann W., Jeffery J. // Anal. Biochem. 1989. V. 178. P. 82–87.
11. Philippson P., Stoltz A., Scherf C. // Methods in Enzymology. 1991. V. 194. P. 169–182.
12. Polaina J., Adam A.C. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 5443.
13. Miller J.F., Bolen D.W. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978. V. 81. P. 610–615.
14. von Hippel P.H., Wong K.-Y. // Science. 1964. V. 145. P. 577–580.
15. Castellino F.J., Barker R. // Biochemistry. 1968. V. 7. P. 4135–4138.
16. Gordon J.A. // Biochemistry. 1972. V. 11. P. 1862–1870.
17. Saito Y., Wada A. // Biopolymers. 1983. V. 22. P. 2123–2132.
18. Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J. // Biochemistry. 1979. V. 18. P. 5294–5299.
19. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.H., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. // J. Clin. Microbiol. 1990. V. 28. P. 495–503.
20. Chomczynski P. // Biotechniques. 1993. V. 15. P. 532–534, 536–537.
21. Chomczynski P., Mackey K., Drews R., Wilfinger W. // Biotechniques. 1997. V. 22. P. 550–553.
22. Булат С.А., Мироненко Н.В., Жолкевич Ю.Г. // Генетика. 1995. Т. 31. С. 315–323.
23. Birnboim H.C., Doly J. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. P. 1521–1523.
24. Pichia Expression Kit. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Invitrogen Co., 1997.

25. Шпаковский Г.В., Шематорова Е.К. // Биоорганская химия. 1998. Т. 24. С. 933–937.
26. Vilgalys R., Hester M. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 4238–4246.
27. Liang Q., Richardson T. // Biotechniques. 1992. V. 13. P. 730–732, 735.
28. Chen H.-R., Hsu M.-T., Cheng S.-C. // Biotechniques. 1995. V. 19. P. 744, 746.
29. Haaning J., Osvig C., Overgaard M.T., Sottrup-Jensen L. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1997. V. 42. P. 169–172.
30. Jesnowski R., Naering J., Wolf K. // Curr. Genet. 1995. V. 27. P. 318–319.
31. Ramotar D. // Mol. Cell. Biochem. 1995. V. 145. P. 185–187.
32. Wang H., Kohalmi S.E., Gatler A.J. // Anal. Biochem. 1996. V. 237. P. 145–146.
33. Akada R., Murakane T., Nishizawa Y. // Biotechniques. 2000. V. 28. P. 668–670, 672.
34. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. 6.3–6.19.
35. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

A New Approach to the Isolation of Genomic DNA Samples from Yeast and Fungi: Preparation of DNA-containing Cell Envelopes and Their Use in PCR

V. N. Danilevich[#] and E. V. Grishin

[#]Phone: +7 (095) 336-6540; fax +7 (095) 330-7301; e-mail: dan@mail.ibch.ru

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10,
GSP Moscow, 117997 Russia*

A simple and rapid procedure for the preparation of yeast and fungal DNA samples useful in PCR amplification was developed. The DNA was purified from proteins, lipids, polysaccharides, and other impurities by their high-temperature extraction (in a boiling water bath) with buffer solutions containing chaotropic salts. Under these conditions, yeast and fungal cell envelopes remain unbroken and retain the original DNA and RNA that could be used for direct PCR amplification. We called the proposed PCR technique as the PCR using DNA-containing cell envelopes. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: *DNA-containing cell envelopes; genomic DNA isolation, PCR amplification, protein and lipid extraction, yeast and filamentous fungi*