

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЖЕВАТЕЛЬНЫХ КОМПОЗИЦИЙ В КАЧЕСТВЕ  
МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ДНК ПРИ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ  
ИНТЕНСИВНОСТИ НАДАВЛИВАНИЯ ЗУБОВ**

**Осипов Н.В.**

**Научные руководители – канд. биол. наук, доц. Субботина Т.Н.,  
канд. мед. наук Ольховский И.А.**

***Сибирский федеральный университет***

***Красноярский филиал «Гематологический научный центр» Минздрава России***

В настоящее время молекулярно-генетические исследования приобретают все большее значение в диагностике заболеваний человека. В связи с этим растет потребность в более надежном, эффективном и неинвазивном методе получения проб биологического материала для дальнейшего анализа нуклеиновых кислот.

Процедура венепункции достаточно болезненна для пациента и сопряжена с определенным риском. Взятие буккального эпителия также является методом, сопряженным с возможностью ранения слизистой ротовой полости и не всегда оптимальны с эстетической точки зрения. В качестве альтернативного неинвазивного метода взятия и накопления биологического материала нами предлагаются жевательные композиции на натуральной и синтетической основе. Более длительный контакт с клетками слизистой и высокий сорбционный потенциал позволяют надеяться на более эффективное выделение генетического материала как человека, так и присутствующих в ротовой полости вирусов. Кроме этого, использование жевательных композиций для выделения ДНК более удобно применять как неинвазивный метод при обследовании детей.

Целью данной работы явилась разработка способа выделения ДНК из жевательных композиций в высоких концентрациях.

Для решения данной задачи было выдвинуто предположение, что низкая концентрация ДНК в жевательных композициях вызвана интенсивным сдавливанием зубами, создающими большое давление, ведущее к разрушению структуры молекулы. Для эксперимента были отобраны 6 композиций, употреблявшиеся с разной интенсивностью сдавливания. То есть первый номер употреблялся с сильным надавливанием поверхности зубов на композицию, затем второй образец испытывал среднее сдавливание и очень слабое на третьем образце. Далее в обратном порядке – четвертый номер испытывал сильное давление зубов, пятый среднее и очень сильное на шестом. При этом предполагаемая концентрация должна расти от первого образца к третьему и четвертому, и постепенно снижаться к шестому, прямо и обратно доказывая предположение об отрицательном воздействии давления, создаваемого зубами, на молекулы нуклеиновых кислот.

После употребления, из жевательных композиций были выделены нуклеиновые кислоты коммерческим набором для выделения ДНК (СорбВ, ЦНИИ Эпидемиология) с измененным протоколом, в котором присутствовали все этапы выделения ДНК: лизирование материала в растворе детергента, добавление и экспозиция сорбента для нековалентного связывания с нуклеиновыми кислотами, серия очисток сорбента с применением спиртовых отмывочных растворов, просушивание и последний этап – элюирование, при котором молекулы ДНК теряют водородную связь с поверхностью сорбента и попадают в раствор с высокой ионной силой, который может быть использован в дальнейших исследованиях. Изменение протокола выделения состояло в том, что жевательные композиции растворялись непосредственно в лизирующем растворе. При этом образующийся осадок сильно затрудняет дальнейшие этапы

выделения и лизированный материал подвергался центрифугированию с последующим переносом надосадочной жидкости в новую пробирку. Далее выделение нуклеиновых кислот проходило по стандартному протоколу, включавшему все вышеперечисленные этапы.

Концентрацию ДНК измеряли с использованием реагентов dsDNA HS Assay Kit и флуориметра Qubit (Invitrogen) с использованием интеркалирующих соединений, взаимодействующих с двуцепочечной молекулой ДНК и дающих при определенной длине волны свечение, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации ДНК. Для исследования были отобраны три образца с предполагаемым уменьшением концентрации нуклеиновых кислот по мере усиления давления со стороны зубов на жевательные композиции и, соответственно, на молекулы ДНК. Первый образец подвергался высокому сдавливанию, второй умеренному и третий – слабому. Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрация ДНК (флуориметр Qubit), выделенной из жевательных композиций, полученных при жевании с разной силой сдавливания

№ образца	1	2	3
Интенсивность сдавливания жевательных композиций зубами	Высокая	Умеренная	Слабая
Концентрация ДНК, нг/мкл	0,567	2,67	4,53

Для подтверждения предположения были отобраны еще три композиции, в которых усиление давления шло в обратном порядке, то есть четвертый образец подвергался высокой, пятый умеренной, а третий – слабой интенсивности жевания. В этом эксперименте для измерения концентрации применялся спектрофотометрический метод, основанный на поглощении молекулами ДНК света ультрафиолетового спектра при длине волны 260 нм. В качестве бланка использовался элюирующий буфер. При этом расчет концентрации проводится исходя из соответствия того, что поглощение 1 нг/мкл ДНК равняется 0,02 оптическим единицам. Соответственно, поглощение в одну оптическую единицу дает раствор с концентрацией ДНК 50 нг/мл. Таким образом, полученные значения экстинкции умножали на коэффициент 50 и полученные данные соответствовали концентрации ДНК в образце. Результаты исследования приведены в таблице 2.

Таблица 2. Концентрация ДНК (спектрофотометр SmartSpec Plus, Biorad), выделенной из жевательных композиций, полученных при жевании с разной силой сдавливания

№ образца	1	2	3	4	5	6
Интенсивность сдавливания жевательных композиций зубами	Высокая	Умеренная	Слабая	Слабая	Умеренная	Высокая
Концентрация ДНК, нг/мл	0,677	2,42	4,26	5,36	2,81	0,489

Как видно из таблиц 1 и 2 концентрация ДНК зависит от силы сдавливания, что подтверждает предположение о негативном влиянии чрезмерного давления зубов на молекулы ДНК в жевательных композициях. Таким образом, показано, что при использовании жевательных композиций в качестве материала для извлечения ДНК необходимо учитывать интенсивность надавливания зубов на жевательную композицию, а также на адсорбированные на ней молекулы нуклеиновых кислот.