

1. Wang H.D. CDH1 germline mutation in hereditary gastric carcinoma /H.D. Wang, J. Ren, L. Zhang // World Gastroenterology. – 2004. – Vol. 10, No 2. – P. 3088–3093.
2. Doublex sequencing in molecular diagnosis of hereditary diseases / J. Plaschke [et al.] // BioTechniques. – 1998. – Vol. 24. – P. 838–841.
3. Loss of E-cadherin expression in early gastric cancer / P. Blok [et al.] // Histopathology. – 1999. – Vol. 34, No 5. – P. 410–5.

METHODOLOGY OF IDENTIFYING CDH1 GENE MUTATIONS WITH SNP-ANALYSIS

L.V. Uzlova

Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

uzlovaliza@gmail.com

The amount of reagents for PCR-mixture picked up by experimental way. PCR temperature and time modes were selected. Two oligonucleotide primers – direct and reverse – were used for every CDH1 SNPs. Direct sequencing was performed with ABI BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Analysis was carried out on 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The results were processed with Sequencing Analysis Software v6.0.

Methodology of identifying with SPN-analysis was adapted for CDH1 gene mutations. Oligonucleotides, reaction mixture and reagents were selected for qualitative PCR analysis of CDH1. Sequencing protocols were prepared for the following sequencing with ABI Prism 3500. Molecular genetic analysis of the material revealed clinically important mutations in «critical regions» of CDH1.

Field of application: medical science (oncology).

АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ РЕСТРИКЦИИ АМПЛИФИЦИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ ГЕНОВ *CRN1* И *CRN2* В РАЗЛИЧНЫХ ИЗОЛЯТАХ *RHYTORH* *THORAINFESTANS*

А.И. Царь, А.М. Ходосовская

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

fryctori@mail.ru

Выявление генов эффекторных белков фитопатогенов и расшифровка их функций является задачей так называемой «эффекторной биологии» –

нового направления молекулярной фитопатологии, посвященного молекулам патогенов, которые передаются в клетки и ткани растений и участвуют в регуляции инфекционного процесса [1].

Целью данной работы явилась амплификация фрагментов генов *crn1* и *crn2*, кодирующих С-концевые участки соответствующих эффекторных белков в ДНК различных изолятов *Phytophthora infestans*, и их последующая рестрикция.

В работе использованы 17 штаммов *P. infestans*, выделенных на территории Беларуси в 2010–2012 годах, из коллекции кафедры молекулярной биологии БГУ. ПЦР и рестрикцию проводили, как описано ранее [2]. Для рестрикции ампликонов *crn1* использовали рестриктазы *PvuII* и *ClaI*, для ампликонов *crn2* – фермент *EcoRI*.

В ДНК всех исследованных штаммов получены ПЦР-продукты исследуемого участка гена *crn1* ожидаемого размера 681 п.н., и в ДНК 16 штаммов (исключение составила ДНК штамма 2В11) амплифицированы участки гена *crn2* размером 710 п.н. Расщепление ампликонов *crn1* с помощью рестриктазы *PvuII* в случае всех штаммов привело к образованию фрагментов размером примерно 550 и 130 п.н., в некоторых ампликонах присутствовали также негидролизированные фрагменты исходного размера, несмотря на варьирование условий рестрикции. Аналогичный характер расщепления наблюдался в случае использования для анализа данных ампликонов рестриктазы *ClaI* (размеры полученных фрагментов около 450 и 250 п.н.), за исключением одного штамма, продукты рестрикции ампликонов которого получить не удалось (штамм 2Тд). В результате рестрикции ПЦР-продуктов участка гена *crn2* с помощью эндонуклеазы *EcoRI* выявлены ожидаемые фрагменты с размерами 460 и 250 п.н., в ДНК всех штаммов за исключением одного (штамм 8ж), и в отдельных случаях на электрофореграммах присутствовали негидролизированные ДНК исходного размера.

Для объяснения полученных результатов был осуществлен биоинформационный анализ возможных амплифицируемых последовательностей (программа Primer BLAST) на основе имеющегося сиквенса референсного генома *P. infestans*[3]. Выявлено 7 генов (программа Artemis), имеющих комплементарные последовательности в области отжига праймеров для гена *crn1*, позволяющие получить ампликоны одинакового размера. Все гены расположены в области *crn*-семейства и собраны в 3 кластера. В случае праймеров для гена *crn2* возможна амплификация участков 6 различных генов с одинаковыми

размерами конечных продуктов, которые сосредоточены в области *crn*-семейства и собраны в 4 кластера.

Таким образом, несмотря на многочисленность возможных амплифицируемых последовательностей *crn1*- и 2-подобных генов, имеется однотипный характер рестрикции (для каждого фермента) ДНК ампликонов из различных штаммов за редким исключением.

1. Torto, T. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from *Phytophthora* / T. Torto [et al.] // Genome Res. – 2003. – V.13. – P. 75–85.

2. Волос. Ю.Ю. Выявление генов эффекторных белков CRN1 и CRN2 в различных изолятах *Phytophthora infestans* / Ю.Ю. Волос, А.М. Ходосовская // Сб. работ 70-й науч. конф. студ. и аспирантов Белгос. ун-та, 15–18 мая 2013 г., Минск: В 3 ч. Ч.1 / Белорус. госун-т. – Минск: Изд. центр БГУ, 2013. – С. 3–8.

3. Haas, B.J. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* / B.J. Haas [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 461. – P. 393–398.

ANALYSIS OF THE PECULIARITIES OF RESTRICTION OF THE AMPLIFIED FRAGMENTS OF CRN1 AND CRN2 GENES IN THE DIFFERENT ISOLATES OF PHYTOPHTHORA INFESTANS

A.I. Tsar, A.M. Khodosovskaya

Belarusian State University, Minsk, Belarus

fryctori@mail.ru

The purpose of this work was the amplification of fragments of the genes *crn1* and *crn2*, encoding the C-terminal regions of the corresponding effector proteins in the DNA of 17 strains of oomycete *Phytophthora infestans*, isolates at the territory of Belarus, and their subsequent restriction. It was estimated a single-type restriction pattern (for each of three enzymes) of DNA amplicons from different strains with rare exceptions. A bioinformatic analysis of the possible amplified sequences (the Primer BLAST program) was carried out based on the existing sequence of the reference genome *P. infestans*. Seven genes have been found that have complementary sequences in the annealing region of primers for the *crn1* gene, which make it possible to obtain amplicons of the same size (program Artemis). All genes are located in the region of the *crn*-family and are assembled into 3 clusters. In the case of primers for the *crn2* gene, it is possible to amplify 6 different genes with identical sizes of the final

products that are assembled into 4 clusters. The results obtained are important for "effector biology" – a new direction of molecular phytopathology devoted to pathogen molecules that are transmitted to plant cells and tissues and participate in the regulation of the infectious process.

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ITS-ОБЛАСТЕЙ рДНК ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ИЗОЛЯТОВ *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Т.С. Червякова, А.М. Ходосовская

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
Boomis1996@mail.ru

Гены рДНК обладают высокой эволюционной консервативностью, однако транскрибируемые спейсеры внутри генного локуса (ITS) проявляют у эукариот вариабельность по длине и нуклеотидной последовательности. Область рДНК используют для изучения как межвидовых, так и внутривидовых отличий между организмами.

Оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) deBary является возбудителем фитофтороза картофеля и томата, который приводит к значительным потерям урожая [1]. Патоген обладает высокой изменчивостью, которая позволяет ему приспосабливаться к новым фунгицидам [2]. Молекулярная дифференциация штаммов патогена позволяет во многих случаях прогнозировать их вирулентность и характер распространения заболевания. Несколькими авторами установлена вариабельность области рДНК в изолятах *P. infestans* [3, 4]. Целью данного исследования явился анализ ITS-областей рДНК в 8 штаммах *P. infestans*, выделенных на территории Республики Беларусь. В работе были использованы штаммы 2B11, A2, Ка-2, 8ж, Вол3(2), A1, 2B3, 2Пле из коллекции кафедры молекулярной биологии БГУ. Для изучения молекулярной дифференциации штаммов *P. infestans* использовали рестрикционный и SSCP-анализ (метод одноцепочечного конформационного полиморфизма) областей ITS1 и ITS2 рДНК.

Амплификацию участков ITS1 и ITS2 локуса рДНК осуществляли с помощью универсальных пар праймеров ITS5/2 и ITS3/4 соответственно. Для всех штаммов получены ПЦР-продукты размером соответственно 360 и 700 п.н. Рестрикционный анализ области ITS1c эндонуклеазой *DraI*