

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ КЛЕТОЧНОЙ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ КОЛИЧЕСТВА ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Б.О. Роик

аспирант, кафедра физиологии и химии им. проф. А.А. Сысоева,
Курская государственная сельскохозяйственная академия им. И.И. Иванова
E-mail: bogdan.biochem.roik@mail.ru

М.М. Наумов

д.в.н., профессор, кафедра физиологии и химии им. проф. А.А. Сысоева,
Курская государственная сельскохозяйственная академия им. И.И. Иванова
E-mail: naumovmm@rambler.ru

Нуклеиновые кислоты хлореллы участвуют в передаче закодированной генетической информации от поколения к поколению микроводоросли, обеспечивая сохранность и долговечность вида. Информация о количестве нуклеиновых кислот, присутствующих в хлорелле, позволит в дальнейшем создать препараты на основе ДНК и РНК в виде натриевых солей. Представлены результаты количественного анализа нуклеиновых кислот в зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* (штамм ИФР № С-111). Щелочной и кислотный гидролиз РНК и ДНК из биомассы данного микроорганизма проводился по адаптированному и приспособленному биохимическому методу Шмидта–Тангаузера. Разработан и модернизирован эффективный метод фотоколориметрического определения количества ДНК и РНК в гидролизате по специфическим цветным реакциям на углеводные мономеры дезоксирибозу и рибозу соответственно, с использованием 96-луночного планшетного фотометра-ридера, применяемого для иммуноферментного (ИФА) скрининга. Определен экспериментально оптимальный светофильтр на 620 нм (оранжевый) для регистрации окрашенных соединений дезоксирибозы и рибозы после цветных реакций специфическими растворами реагентов дифениламина и орцина. Построены соответствующие градуировочные зависимости с коэффициентом линейности не менее $r = 0,999$ для количественного определения ДНК и РНК в объеме гидролизатов, что позволило определить количество нуклеиновых кислот в навеске биомассы *Chlorella vulgaris*.

Ключевые слова: дезоксирибоза, ДНК и РНК, метод Шмидта-Тангаузера, микроводоросли, нуклеиновые кислоты, рибоза, фотоколориметрия, *Chlorella vulgaris*.

Для цитирования: Роик Б.О., Наумов М.М. Выделение нуклеиновых кислот из клеточной биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* и определение их количества фотоколориметрическим методом. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020; 23(1): 36–41. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-01-06>

Зеленая микроводоросль рода *Chlorella vulgaris* является наиболее распространенным и традиционным представителем рода зеленых одноклеточных, коккоидных форм, водорослей, которые размножаются с помощью автоспор и имеют размеры клеток от 2 до 10 мкм [1, 2].

Глубокое изучение этой микроводоросли по морфологическим, биохимическим, физиологическим, а также фармакологическим принципам способствовало значительному обогащению знаний как о самой клетке, так и об ее уникальном биохимическом составе, что подтверждается рядом научных публикаций по данной тематике [1–12]. Обладая функциями живого организма, микроводоросль *Ch. vulgaris*, наряду с другими биологическими компонентами, имеет богатый и уникальный нуклеиновый состав, за счет которого и обеспечивается столь долгий собственный генетический возраст.

Нуклеиновые кислоты хлореллы участвуют в передаче закодированной генетической информации от поколения к поколению микроводоросли и вследствие этого обеспечивают сохранность, долговечность вида и постоянную регенерацию поврежденного материала.

Достаточно много исследований посвящено изучению полезных свойств хлореллы, которые в большей мере обеспечивают поддержку иммунной системы организма человека или животного при употреблении ее в пищу. Многие ученые придерживаются мнения, что уникальный биохимический состав клеточной структуры хлореллы повышает иммунитет и резистентность организма при употреблении ее в пищу, что определяется комплексом витаминов, аминокислот, пептидов, минералов и других биологически важных компонентов, особенно количеством нуклеиновых кислот ДНК и

РНК, которые, в свою очередь, имеют особое значение в процессах регенерации клеточного материала организма [3–5]. Возможно, своему иммуномодулирующему свойству хлорелла обязана также высокой концентрации нуклеиновых кислот, за счет которых происходит активная выработка необходимых веществ в организме, что подтверждено публикациями по изучению иммунологических свойств нуклеиновых кислот на организм [6–12].

Таким образом, в основу исследования легли задачи, направленные на улучшение и адаптацию существующего метода Шмидта–Тангаузера по выделению нуклеиновых кислот, который был применен для экстракции ДНК и РНК из клеток микроводоросли *Ch. vulgaris*, а также на модификацию фотокolorиметрического количественного определения с использованием микропланшетного фотометра (ИФА) по цветным реакциям на дезоксирибозу и рибозу. Результаты данной работы о количестве нуклеиновых кислот в микроводоросли *Ch. vulgaris* помогут в дальнейшем создать перспективные решения для разработки и получения нового лечебно-профилактического препарата на основе ДНК и РНК для применения в ветеринарной и животноводческой практике.

Ц е л ь р а б о т ы – экстракция нуклеиновых кислот и определение количественного содержания суммы ДНК и РНК, содержащихся в микроводоросли *Ch. vulgaris*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект изучения – зеленая микроводоросль рода *Ch. vulgaris* (штамм ИФР № С-111, России). В работе использовали сухую биомассу хлореллы, получаемую методом лиофильной сушки в виде зеленого мелкодисперсного порошка, вследствие чего клеточная оболочка хлореллы не разрушается, а обезвоживается, сохраняя при этом все внутриклеточные компоненты. Подготовительный этап выделения нуклеиновых кислот из микроводоросли заключался в тщательном перетирании биомассы с инертным стеклянным порошком, измельченным до мелкокристаллического состояния. Данная операция предполагала наиболее эффективное механическое разрушение толстых клеточных стенок хлореллы. Дальнейшую работу проводили с использованием современного оборудования и приборов, отвечающих всем нормам надлежащей лабораторной практики (GLP). Приведенные приборы, аппаратура и лабораторная посуда были полностью исправны, отвечали высоким требованиям

анализа и подготовки проб к исследованиям, имели на момент исследования соответствующую аттестацию и квалификацию.

Оборудование и реактивы: водяная баня ИКА HB10 digital (20–180 °С) (VWR); центрифуга CENTRIFUGECM-6M (ELM), Латвия); весы электронные лабораторные (OHAUS, США); микропланшетный фотометр «Infinite F50» (TECAN, Австрия GmbH); 96-микролуночные одноразовые пластиковые планшеты для планшетного фотометра или ИФА-анализатора; дозаторы механические (1–5 мл; 100–1000 мкл) («Sartorius», «BioHit»); морозильная камера от –18 до –20 °С, для заморозки клеток хлореллы; пробирки центрифужные с крышкой градуированные пластмассовые; пробирки градуированные с притертой пробкой (ГОСТ 1770-74); обратные холодильники или воздушные для пробирок; емкость с тающим льдом для проведения реакции; хлорная кислота (HClO₄, ГОСТ 6552-80, АО «ЛенРеактив», Россия); гидроокись калия (KOH, ГОСТ 24363-80, Россия); гидроокись натрия (NaOH, ГОСТ 2263-79, Россия); уксусная кислота ледяная (CH₃COOH, ГОСТ 61-75, ВЕКТОН, Россия); дифениламин (C₁₂H₁₁N, ТУ 6-09-5467-90, «ЛенРеактив», Россия); орцинол или орцин(CH₃×C₆H₃(OH)₂×H₂O, «Laboratory BDH Reagent», Англия, Product № 29418); серная кислота (H₂SO₄, ГОСТ 4204-77, ВЕКТОН, Россия); соляная кислота (HCl, ГОСТ 3118-77, ВЕКТОН, Россия); железо хлорное 6-водное (FeCl₃×6H₂O, ГОСТ 4147-74, «НеваРеактив», Россия); этилацетат (ГОСТ 22300-76, ВЕКТОН, Россия); хлороформ (ВЕКТОН, Россия); спирт этиловый охлажденный (ГОСТ Р 55878-2013); препарат D-рибоза, в качестве стандарта РНК («BioChem», Франция); препарат 2-D-дезоксирибоза, в качестве стандарта ДНК («BioChem», Франция); индикаторная бумага, универсальная для рН; хлорид натрия; цитрат натрия.

Были приготовлены специальные реактивы для селективной окраски ДНК и РНК. Орциновый реактив (определение РНК): 1,0 г орцина (орцинола, 5-метилрезорцина) растворяли в 500 см³ 30%-ной соляной кислоты и добавляли 5 мл 10%-ного хлорного железа. Реактив хранили в темной склянке и плотно закрытым во избежание испарения кислоты.

Реактив Дише (определение ДНК): 1,0 г дифениламина, дважды перекристаллизованного из 70%-ного этанола, растворяли в 100 см³ ледяной уксусной кислоты и добавляли 2,75 см³ серной кислоты [13, 14].

Выделение нуклеиновых кислот из хлореллы адаптированным методом Шмидта–Тангаузера. Данный метод выделения и разделения нуклеиновых кислот из зеленой микроводоросли наряду с другими возможными методами наиболее полно оказался приемлемым и был нами улучшен и адаптирован к исследуемому биоматериалу. Метод, предложенный Шмидтом и Тангаузером, позволяет экстрагировать из одной навески биоматериала РНК и ДНК отдельно друг от друга, что обеспечивает наиболее точные расчеты их количества в хлорелле [13, 14].

Подготовленный таким образом биоматериал микроводоросли *Ch. vulgaris* в количестве $1,0 \pm 0,2$ г поместили в фарфоровую ступку. Для анализа тенденции и прогнозирования результата выделения нуклеиновых кислот из хлореллы, то же самое проделали для навесок 0,5; 5,0; 10,0 и 50,0 г, пропорционально рассчитав внесенные далее реагенты. При дополнительном разрушении клеточного материала хлореллы применили механический лизис, для этого добавили 0,5 г дисперсного стеклянного порошка и в течение 5 мин перетерли содержимое пестиком до состояния гомогенной массы. Поместили в ступку 5 см^3 цитратно-солевого раствора (1:1), $0,10 \text{ моль/дм}^3$ хлорида натрия и $0,025 \text{ моль/дм}^3$ цитрата натрия, перемешали содержимое и добавили 5 см^3 0,5 н раствора хлорной кислоты (HClO_4). В течение 2 мин перетерли содержимое ступки. Полученную гомогенную смесь центрифугировали в течение 20 мин при 3500 об/мин. Надосадочную жидкость, содержащую низкомолекулярные и кислоторастворимые компоненты, отбросили. Все операции протекали быстро на холоду и с охлажденными растворами реагентов. От кислоты в осадке избавились двукратной отмывкой осадка деионизированной водой с последующим центрифугированием при тех же условиях. Подготовленный осадок, содержащий белки, нуклеиновые кислоты, пигменты и липиды, промыли 15 см^3 смеси «этанол–хлороформ» (3:1), хорошо помешивая стеклянной палочкой. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об/мин и отбросили надосадочный раствор (темно-зеленого цвета), содержащий липиды и пигменты. К практически обесцвеченному осадку добавили 15 см^3 смеси «этанол–этилацетат» (1:1), тщательно перемешали для удаления остаточных количеств пигмента и липидов. При тех же условиях центрифугировали смесь и отбросили надосадочную жидкость. Полученный осадок, содержащий белки и нуклеиновые кислоты, двукратно от-

мыли этиловым спиртом (по 10 см^3) от остатков эфира.

Щелочной гидролиз нуклеиновых кислот из полученного осадка проводили с $10,0 \text{ см}^3$ 0,5 н. раствора гидроксида калия на водяной бане в течение 1 ч при $45 \text{ }^\circ\text{C}$. При данных условиях происходит полное извлечение нуклеиновых кислот из данного клеточного материала. Полученный гидролизат охладили до $0\text{--}2 \text{ }^\circ\text{C}$, поместив по окончании процесса в емкость с тающим льдом, а затем центрифугировали 10 мин при 3500 об/мин. После данных операций надосадочный раствор содержал нуклеиновые кислоты. Осадок, состоящий из белков и других компонентов, промыли охлажденным раствором 0,5 н. КОН и отбросили, а щелочные гидролизаты объединили. К объединенному щелочному гидролизату прибавили охлажденную HClO_4 (конц.) по каплям до $\text{pH}=1$ по универсальному индикатору, аккуратно перемешивая содержимое. В процессе нейтрализации выпал белый осадок, состоящий из ДНК, остатков белка и перхлората калия. Содержащий продукты РНК раствор далее центрифугировали, замеряли объем ($\sim 10 \text{ см}^3$) и определяли количество РНК методом колориметрического анализа по специфической цветной реакции на углеводный мономер D-рибозу.

Осадок, содержащий ДНК и белок, смешали с $10,0 \text{ см}^3$ 0,5 н. HClO_4 и подвергли кислотному гидролизу на водяной бане при $100 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 30 минут. При этом белок денатурирует и выпадает в осадок, а ДНК образуется в растворе кислоты. Полученный гидролизат, содержащий ДНК, охладили и центрифугировали. Методом колориметрического анализа, но уже с использованием ИФА-фотометра, определяли количество ДНК в растворе по специфической цветной реакции на углеводный мономер D-2-дезоксирибозу [13, 14].

Перед фотометрическим измерением стандартных образцов и полученных гидролизатов ДНК и РНК из микроводоросли *Ch. vulgaris* были проведены специфические цветные реакции на пентозы нуклеиновых кислот. Данный процесс заключался в получении окрашенных комплексов дезоксирибозы и рибозы с дифениламином и орцином соответственно. Для приготовления градуировочных растворов ДНК использовали коммерческий препарат 2-D-дезоксирибозы. Готовили серию градуировочных растворов с концентрациями 5,0; 2,5; 2,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01; 0 мг/см^3 . Серию градуировочных растворов РНК идентичных концентраций готовили из коммерческого реактива D-рибозы.

К 1,0 см³ каждого раствора стандарта и гидролизатов ДНК и РНК добавляли по 1,0 см³ хлорной кислоты и гидролизовали в течение 20 мин при 100 °С. Далее с каждым полученным кислотным раствором проводили специфические реакции на пентозы. При этом молекулы ДНК окрашивались по 2-Д-дезоксирибозе с применением реактива Дише в синий цвет, а молекулы РНК окрашивались орциновым реактивом по углеводному мономеру Д-рибозе в зеленый цвет.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты полученных градуировочных зависимостей для определения содержания ДНК и РНК в биомассе микроводоросли *Ch. vulgaris* представлены в виде графиков (рис. 1 и 2).

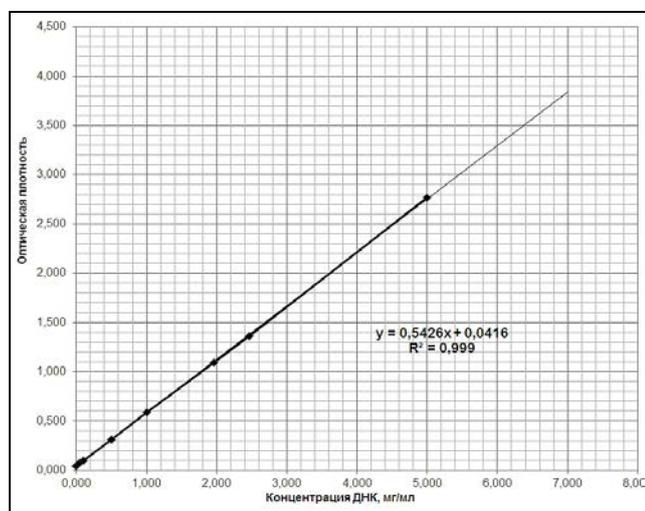


Рис. 1. Градуировочная зависимость количества ДНК от интенсивности окраски 2-Д-дезоксирибозы

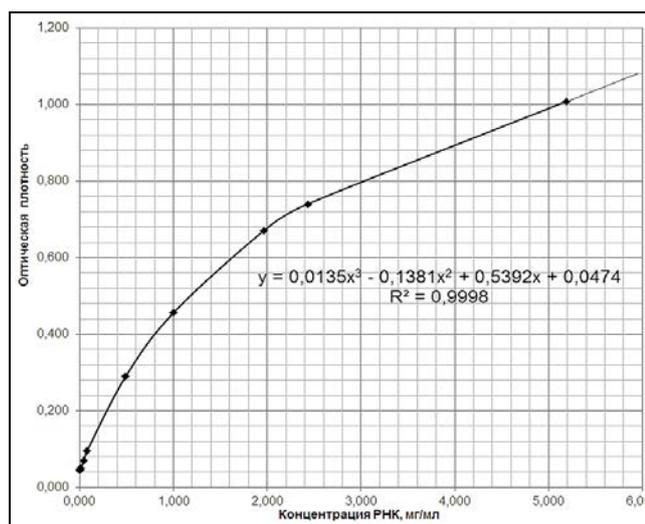


Рис. 2. Градуировочная зависимость количества РНК от интенсивности окраски Д-рибозы

Реакцию на дезоксирибозу проводили по следующей схеме: 1 см³ гидролизата (или стандарта ДНК) на 2 см³ реактива Дише, затем 10 мин выдерживали на кипящей водяной бане до образования стойкого окрашенного комплекса синего цвета. Определение ДНК в растворе выполняли на фотометре TECAN Infinite F50, используя оранжевый светофильтр 620 нм. На рис. 1 представлен градуировочный график для определения количества ДНК по окрашенной 2-Д-дезоксирибозе, из которого видно, что интенсивность окраски, определяемая оптической плотностью окрашенной дезоксирибозы, пропорциональна количеству ДНК в растворе, что подтверждается линейностью и коэффициентом линейной регрессии $R = 0,999$.

Реакцию на рибозу проводили по следующей схеме: 1 см³ гидролизата (или стандарта РНК) на 1 см³ орцинового реактива, затем 15 мин выдерживали на кипящей водяной бане до образования стойкого окрашенного комплекса зеленого цвета. Определение РНК в растворе проводили на фотометре TECAN Infinite F50, используя оранжевый светофильтр 620 нм. Цвет обуславливается наличием пентозы РНК. На рис. 2 представлен градуировочный график для определения количества РНК по окрашенной Д-рибозе.

Интенсивность окраски, определяемая оптической плотностью окрашенной рибозы, пропорциональна количеству РНК в растворе. В ходе построения градуировочного графика было установлено, что определение РНК по данному методу не протекает в условиях линейной функции, однако коэффициент линейной регрессии равен $R = 0,9998$. При этом в условиях проверки контрольных образцов с известным содержанием рибозы на всем промежутке градуировочной зависимости были выявлены достаточно низкие расхождения, не влияющие на результат.

В перспективе для создания ветеринарного лечебно-профилактического препарата на основе нуклеиновых кислот важной составляющей является информация о сумме выделенных из хлореллы ДНК и РНК с целью получения общего количества нуклеиновых кислот.

В связи с этим очищенные гидролизаты ДНК и РНК объединяли, замеряли общий объем, и в соотношении 3:1 медленно приливали в высокую емкость с охлажденным до 2–4 °С 96%-ным этиловым спиртом. Вследствие этого выпадал хлопьевидный осадок, состоящий из нуклеиновых кислот. При помощи центрифугирования избавля-

лись от надосадочной жидкости, а осадок высушивали в токе воздуха. Высушенный осадок перетерали в ступке до мелкодисперсного состояния, а затем взвешивали. На рис. 3 показана зависимость количества нуклеиновых кислот от количества биомассы микроводорослей *Ch. vulgaris*, взятой для экстракции. Из представленной тенденции видно, что при взятых навесках биомассы хлореллы 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 и 50,0 г пропорционально растет суммарное количество выделяемых нуклеиновых кислот 0,068; 0,125; 0,650; 1,440; 6,34 г соответственно. При этом на всем промежутке графика соблюдается линейность функции ($R = 0,9992$). Приведенные значения количества нуклеиновых кислот являются усредненными, поскольку проведены три параллельных опыта экстракции и измерения.

Для измерения оптической плотности полученных окрашенных комплексов использовали 96-луночный планшетный анализатор (используемый при иммуноферментном анализе) «Infinite F50» (TECAN, Австрия). В работе применяли стерильный 96-луночный микропланшет – «Greiner 96 U transparent», без нанесения на внутренние стенки плашек каких-либо проявляющих реагентов. При сравнительном исследовании оптических параметров кварцевых кювет (Q10) для фотоколориметра, например КФК с микрокюветами для ИФА, каких-либо отклонений при измерении оптической плотности окрашенных стандартных растворов той же концентрации обнаружено не было.

Настройки программного обеспечения выполнены в соответствии с руководством по эксплуатации «MagellanV 7.0 for F50».

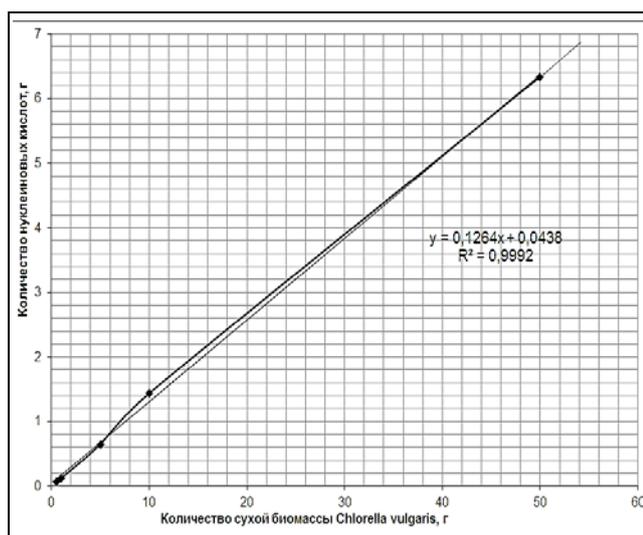


Рис. 3. Зависимость количества нуклеиновых кислот от количества биомассы микроводорослей *Ch. vulgaris*

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что микроводоросли *Ch. vulgaris* являются продуктом, в котором содержится достаточное количество нуклеиновых кислот, что может быть использовано в качестве биологического источника для получения препаратов на основе ДНК и РНК.
2. Примененный способ колориметрического анализа обеспечивает достаточно высокую точность в контроле количества их основных компонентов и качества препаратов на основе нуклеиновых кислот.
3. Определена зависимость выработки в ходе экстракции количества нуклеиновых кислот от количества взятой навески биомассы микроводорослей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bock C., Krienitz L., Pröschold T. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*. 2011; 11(2):293–312.
2. Darienko T., Gustavs L., Mudimu O., et al. Chloroidium, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* 2010; 45:79–95.
3. Роик Б.О., Наумов Н.М., Лукьянов В.А., Наумов М.М. Биохимические показатели и аминокислотный состав кормовой добавки «Альгавет». Материалы Междунар. научно-практич. конф. «Интеграция науки и сельскохозяйственного производства». Ч.1. Курск: КГСХА, 2017. С. 294–296.
4. Хлорелла – суперводоросль с полезными свойствами для здоровья. [Электронный ресурс]. Дата обращения: 21.09.2019. URL: <http://fitfan.ru/nutrition/10258-khlorella-11-super-svojjstv.html>.
5. Huss V.A.R., Scharpf T.K., Kessler E. Deoxyribonucleic-acid reassociation in the taxonomy of the genus *Chlorella*. V. *Chlorella vulgaris*, *C. luteoviridis*, *C. minutissima*, and *C. zofingiensis*. *Arch. Microbiol.* 1989; 152:512–514.
6. Федянина Л.Н., Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. и др. Лекарственные препараты и биологически активные добавки к пище на основе нуклеиновых кислот различного происхождения. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2007; 4:9–12.
7. Каплина Э.Н. Деринат – природный иммуномодулятор для детей и взрослых. М.: Научная книга, 2005.
8. Паушук Л.К., Апрышко Г.Н., Трещалина Е.М. Препараты ДНК как потенциальные терапевтические средства. *Химико-фармацевтический журнал*. 1995; 6:61–64.
9. Серебряная Н.Б., Новик А.А. ДНК как иммуностимулятор (обзор литературы). *Медицинская иммунология*. 2001; 3(1):27–34.
10. Каплина Э.Н. Использование препарата Деринат в различных областях медицины. Материалы 1-й Всеросс. конф. «Использование препарата деринат в различных областях медицины». М., 2000. С. 47.
11. Воронин С., Гуменюк А., Ханис А., Фёдоров Ю. Натрия нуклеинат – эффективный иммуномодулятор. *Животноводство России. Секция Ветеринария*. 2015; 7: 21.
12. Нуклеиновые кислоты, влияние на иммунитет. [Электронный ресурс]. Дата обращения: 21.09.2019. – URL: <http://www.blackpantera.ru/useful/health/dictionary/19413>.

13. Нуклеиновые кислоты: методические указания / Сост. В.А. Шадрикова, В.А. Смирнов, Ю.Н. Климошкин. Самара: Самар. гос. техн. ун-т, 2014. 23 с.
14. Большой практикум «Биохимия». Лабораторные работы: Учеб. пособие / сост. М.Г. Кусакина, В.И. Суворов, Л.А. Чудинова. Пермь: Перм. гос. нац. исслед. ун-т, 2012. 148 с.

Поступила после доработки 8 декабря 2019 г.

EXTRACTION OF NUCLEIC ACIDS FROM THE CELL BIOMASS OF THE MICROALGAE *CHLORELLA VULGARIS* AND DETERMINATION OF THEIR AMOUNT BY PHOTOCOLORIMETRIC METHOD

© Authors, 2020

B.O. Roik

Post-graduate Student,

Department of Physiology and Chemistry name prof. A.A. Sisoev, Kursk SAA name I.I. Ivanov

E-mail: bogdan.biochem.roik@mail.ru

M.M. Naumov

Dr.Sc. (Veterinary), Professor,

Department of Physiology and Chemistry name prof. A.A. Sisoev, Kursk SAA name I.I. Ivanov

E-mail: naumovmm@rambler.ru

The paper presents the results of quantitative analysis of nucleic acids in the green microalgae *Chlorella vulgaris* (IGF strain no. C-111). The nucleic acids present in the *Chlorella* cell are involved in the transmission of encoded genetic information from generation to generation of microalgae, ensuring the safety and longevity of the species. Information about the amount of nucleic acids present in *Chlorella*, will further create drugs based on DNA and RNA in the form of sodium salts. Alkaline and acidic hydrolysis of RNA and DNA from the biomass of the microorganism was carried out according to the adapted and adapted biochemical method of Schmidt-Thanhauser. An effective method of photocolourimetric determination of the amount of DNA and RNA in the hydrolysate from specific color reactions to carbohydrate monomers Deoxyribose and Ribose, respectively, using a 96-well plate photometer-reader used for enzyme immunoassay (ELISA) screening was developed and modernized. Was determined empirically optimal filter at 620 nm (orange) for check painted joints desoxyribose and ribose after color reactions specific solutions of reagents of the diphenylamine and orcin. Appropriate calibration dependences with a linearity coefficient of at least $r = 0.999$ were constructed for the quantitative determination of DNA and RNA in the volume of hydrolysates, which made it possible to determine the amount of nucleic acids in the sample of *Chlorella vulgaris* biomass. This method of colorimetric analysis provides a sufficiently high accuracy in quality control of preparations based on nucleic acids in analytical studies in the laboratory.

Key words: desoxyribose, DNA and RNA, method of Schmidt-Thanhauser, microalgae, nucleic acids, ribose, photocolourimetry method, *Chlorella vulgaris*.

For citation: Roik B.O., Naumov M.M. Extraction of nucleic acids from the cell biomass of the microalgae *Chlorella vulgaris* and determination of their amount by photocolourimetric method. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020; 23(1):36–41. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-01-06>

REFERENCES

- Bock C., Krienitz L., Pröschold T. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*. 2011; 11(2):293–312.
- Darienko T., Gustavs L., Mudimu O., et al. *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* 2010; 45:79–95.
- Roik B.O., Naumov N.M., Luk'yanov V.A., Naumov M.M. Biohimicheskie pokazateli i aminokisljotnyj sostav kormovoj dobavki «Al'gavet». *Materialy Mezhdunar. nauchno-praktich. konf. «Integraciya nauki i sel'skohozyajstvennogo proizvodstva»*. Ch.1. Kursk: KGSKHA, 2017. S. 294–296.
- Hlorella – supervodorosl' s poleznymi svojstvami dlya zdorov'ya*. [Elektronnyj resurs]. Data obrashcheniya: 21.09.2019. URL: <http://fitfan.ru/nutrition/10258-kllorella-11-super-svojjstv.html>.
- Huss V.A.R., Scharpf T.K., Kessler E. Deoxyribonucleic-acid reassociation in the taxonomy of the genus *Chlorella*. V. *Chlorella vulgaris*, *C. luteoviridis*, *C. minutissima*, and *C. zofingiensis*. *Arch. Microbiol.* 1989; 152:512–514.
- Fedyanina L.N., Besednova N.N., Epshtejn L.M. i dr. Lekarstvennye preparaty i biologicheski aktivnyje dobavki k pishche na osnove nukleinovyh kisljot razlichnogo proiskhozhdeniya. *Tihookeanskij medicinskij zhurnal*. 2007; 4:9–12.
- Kaplina E.N. *Derinat – prirodnyj immunomodulyator dlya detej i vzroslyh*. M.: Nauchnaya kniga, 2005.
- Pashuk L.K., Apyrshko G.N., Treshchalina E.M. Preparaty DNK kak potencial'nye terapevicheskie sredstva *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal*. 1995; 6:61–64.
- Serebryanaya N.B., Novik A.A. DNK kak immunostimulyator (obzor literatury). *Medicinskaya immunologiya*. 2001; 3(1):27–34.
- Kaplina E.N. Ispol'zovanie preparata Derinat v razlichnyh oblastyah mediciny. *Materialy 1-j Vseross. konf. «Ispol'zovanie preparata derinat v razlichnyh oblastyah mediciny»*. M., 2000. S. 47.
- Voronin S., Gumenyuk A., Hanis A., Fyodorov Yu. Natriya nukleinat – effektivnyj immunomodulyator. *Zhivotnovodstvo Rossii. Sekciya Veterinariya*. 2015; 7: 21.
- Nukleinovye kisljoty, vliyanie na immunitet. [Elektronnyj resurs]. Data obrashcheniya: 21.09.2019. URL: <http://www.blackpantera.ru/useful/health/dictionary/19413>.
- Nukleinovye kisljoty: metodicheskie ukazaniya / Sost. V.A. Shadrikova, V.A. Sмирнов, Yu.N. Klimochkin. Samara: Samar. gos. tekhn. un-t, 2014. 23 s.
- Bol'shoj praktikum «Biohimiya». *Laboratornye raboty: Ucheb. posobie / sost. M.G. Kusakina, V.I. Suvorov, L.A. Chudinova*. Perm': Perm. gos. nac. issled. un-t, 2012. 148 s.