

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Е. И. Шишацкая

« ____ » _____ 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Подбор рестриктаз для определения видов бактерий методом анализа

ПДРФ

Научный руководитель _____ доцент, к.б.н.О. А. Гусейнов

Выпускник _____ Т. В. Деринг

Красноярск 2019

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 ДНК.....	7
1.2 Генетическая система бактерий.....	8
1.3 Ген 16S рРНК.....	10
1.4 Используемые образцы бактерий.....	11
1.4.1 Бактерии рода <i>Bacillus</i>	11
1.4.2 Бактерии рода <i>Arthrobacter</i>	13
1.4.3 Бактерии рода <i>Achromobacter</i>	14
1.4.4 Бактерии рода <i>Rhodococcus</i>	15
1.4.5 Бактерии рода <i>Nocardia</i>	16
1.4.6 Бактерии рода <i>Micrococcus</i>	17
1.4.7 Бактерии рода <i>Pseudomonas</i>	18
1.4.8 Бактерии рода <i>Agrobacterium</i>	19
1.5 Полимеразная цепная реакция.....	19
1.6 Термостабильные ДНК-полимеразы.....	23
1.7 Электрофорез.....	24
1.8 Эндонуклеазы рестрикции.....	25
1.8.1 BstMB I.....	28
1.8.2 Hae III.....	28
1.8.3 Rsa I.....	29
1.8.4 Msp I.....	29
1.8.5 FatI.....	29
1.8.6 Tru9 I.....	29
1.8.7 Звездчатая активность рестриктаз.....	30
1.9 Метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.....	31
1.10 Анализ <i>insilico</i>	31
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	33
2.1 Объекты идентификации.....	33
2.2 Методика выделения ДНК.....	33
2.3 Методика проведения электрофореза.....	35
2.4 Методика проведения ПЦР.....	36
2.5 Проведение реакции рестрикции.....	37
3 РЕЗУЛЬТАТЫ.....	39

3.1 Проведение анализа <i>insilico</i>	39
3.2 Выделение ДНК из биомассы бактерий.....	42
3.3Получение ампликонов гена 16S рРНК.....	43
3.4Проведение реакций рестрикции.....	44
3.5Сравнение теоретических и экспериментальных данных.....	46
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	56
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	57
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	58

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии - самая древняя группа организмов. Существуют на Земле около 3,5 млрд. лет. Распространены повсеместно: в почве, воде, воздухе, в организмах человека и животных. Их практическое значение для человека трудно переоценить. Технологические штаммы бактерий применяются в пищевой промышленности при приготовлении молочнокислых продуктов, пищевого уксуса; в сельском хозяйстве - использование бактериальных удобрений способствует повышению плодородия, растения меньше болеют и дают больший урожай. В качестве биологической защиты растений от всевозможных вредителей разработаны препараты на основе бактерий, которые не наносят вреда человеку; в медицине и фармакологии - бактерии необходимы при производстве антибиотиков, аминокислот, ферментов, витаминов, противовирусных и гормональных препаратов; в добывающей промышленности - при добыче полезных ископаемых и во многих других сферах жизни человека. Также многие виды используют для создания биопрепаратов по очистке сточных вод, почв от трудноразлагаемых веществ (нефтепродукты, тяжелые металлы, пестициды и другие загрязнители) [1].

Некоторые бактерии являются возбудителями различных заболеваний человека и животных.

Зачастую дифференциация видов бактерий в пределах одного рода весьма затруднена. Классические методы микробиологии не всегда позволяют добиться успеха.

Актуальность работы

Ранее классификация бактерий основывалась на традиционных методах микробиологии, в основе которых лежат морфологические и физиологические признаки: потребности в питании, условиях роста и многое другое. В настоящее время эти методы зачастую плохо работают, особенно это касается некультивируемых организмов.

В последние десятилетия возможности для идентификации бактерий существенно расширились в связи с применением молекулярно-генетических методов.

Наибольший прогресс был достигнут благодаря секвенированию различных маркерных генов. Часто для идентификации используют гены, кодирующие 16S и 23S рибосомальные РНК, поскольку они присутствуют во всех бактериальных клетках и являются родоспецифичными для большинства микроорганизмов [2]. Использование для идентификации гена 16S рибосомальной РНК может позволить различать близкородственные виды и подвиды микроорганизмов.

Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) является одним из наиболее быстрых и перспективных методов идентификации. С помощью данного метода результат возможно получить в течение суток. Он менее чувствителен к загрязняющим примесям по сравнению с секвенированием.

Цель данной работы: выявить наиболее перспективные рестриктазы для идентификации исследуемых бактерий при применении метода анализа ПДРФ гена 16S рРНК.

Для достижения заданной цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Выделить ДНК из опытных образцов бактерий и определить концентрацию и чистоту полученных препаратов ДНК.
2. С помощью метода ПЦР получить ампликоны гена 16S рРНК, ограниченные последовательностями, комплементарными парам праймеров 8F и 1492R с использованием полученных образцов ДНК.
3. Для полученных ампликонов провести реакции рестрикции используя следующий набор рестриктаз: BstMBI, HaeIII, RsaI, MspI, FatI, Tru9 I.
4. Провести электрофорез продуктов гидролиза и проанализировать полученные электрофореграммы.
5. Провести изучение *in silico* ампликонов 8F–1492R гена 16S рРНК почвенных бактерий методом анализа ПДРФ с использованием данных GenBank,

создать массив данных размеров рестриктови построить теоретические электрофореграммы.

6. Сравнить теоретические и практические электрофореграммы и сделать выводы о видовой принадлежности бактерий.
7. Выяснить какие рестриктазы наиболее перспективны для идентификации определенных видов бактерий.

Работа выполнена на кафедре Медицинской биологии в ИнститутеФундаментальной Биологии и Биотехнологии СФУ.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) - макромолекула, обеспечивающая хранение и передачу наследственной информации организмов из поколения в поколение.

В клетках высших организмов ДНК находится в ядре в составе хромосом, а также в некоторых клеточных органоидах. У бактерий и архей кольцевая (реже линейная) молекула ДНК так называемый нуклеоид, прикреплена изнутри к клеточной мембране. У них и у низших эукариот (например, дрожжей) встречаются также небольшие автономные, преимущественно кольцевые молекулы ДНК, называемые плазмидами[3].

С химической точки зрения, ДНК- это полимерная молекула в состав которой, в качестве мономеров входят нуклеотиды.

Нуклеотид состоит из 3 компонентов:

- а) гетероциклического азотистого основания,
- б) углевода – дезоксирибозы,
- в) остатка фосфорной кислоты.

Азотистые основания в природных нуклеотидах представлены двумя типами: пуриновые- аденин (6-аминопурин - А), гуанин (2-амино, 6-оксопурин -G), пиримидиновые- цитозин (2-окси-4-аминопиримидин - С), тимин (5-метил-2,4-диоксопиримидин - Т).

Мономерные остатки связываются 3',5'- фосфодиэфирной связью. Эта связь осуществляется только за счет 3'-ОН-группы одного нуклеотидного остатка и 5'-ОН- группы другого.

Макромолекула ДНК представляет собой правильную правовинтовую спираль, образованную двумя полинуклеотидными цепями, закрученными друг относительно друга и вокруг воображаемой оси. Полинуклеотидные цепи антипараллельны, т.е. одна из них ориентирована в направлении 3'-5' , вторая 5'-3'. Вторичная структура была предложена Дж. Уотсоном и Ф. Криком в 1953

году.

Все азотистые основания цепей расположены внутри двойной спирали, а пентозофосфатный остов – снаружи. Полинуклеотидные цепи удерживаются относительно друг друга за счет водородных связей, которые образуются между аденином одной цепи и тимином другой. При этом образуется две водородные связи. Между гуанином и цитозином образуются три водородные связи. В связи с этим последовательность в одной цепи определяет их последовательность в другой (принцип комплементарности)[4].

1.2 Генетическая система бактерий

Генетический материал прокариот представлен уложенной в компактную структуру молекулой ДНК, и локализованной в ограниченных участках цитоплазмы, не имеющей, в отличие от эукариот ядерной мембраны. Учитывая эти особенности, генетический аппарат прокариот принято называть нуклеоидом[5]. Бактериальный нуклеоид обычно состоит из одной двунитевой молекулы ДНК кольцевой формы[6]. Наследственная информация у бактерий хранится в форме последовательности нуклеотидов ДНК, которая определяет последовательность аминокислотных остатков в молекуле белка. ДНК прокариот имеет существенные отличия в структурной организации от эукариотической ДНК: помимо отсутствия ядерной оболочки, нуклеоид бактерий лишен основных белков гистонов (имеются гистоноподобные белки-НУ, Н-NS, ИНФ, которые принимают участие в компактизации ДНК). Геном компактен, количество кодирующих последовательностей ДНК минимально, гены не несут интронов (за исключением мархей) [7]. Гены - дискретные участки на ДНК, отличающиеся числом и специфичностью последовательности нуклеотидов, в которых зашифрована информация о структуре и свойствах белков. Каждому белку соответствует свой ген. Для кодирования белков часто используются 2 или 3 рамки считывания одной и той же последовательности

ДНК, что повышает кодирующий потенциал генома без увеличения его размера.

Помимо хромосомных генов, кодирующих белки и РНК, в состав геномов прокариот входят другие генетические структуры.

Плазмиды – автономно реплицирующиеся внехромосомные генетические элементы [8]. Как правило, они представляют собой кольцевые молекулы ДНК, длиной от нескольких тысяч до сотен тысяч п.о., но встречаются и линейные формы. В отличие от хромосом плазмиды являются «необязательным» генетическим материалом, потеря которого не приводит к гибели клетки. Однако, многие плазмиды содержат десятки и сотни генов, кодирующих важные для клетки-хозяина функции, которые способствуют их быстрой эволюции и адаптации к различным средам [9]. Приобретаемые с плазмидами новые признаки в ряде случаев определяют названия плазмид: например, F плазида (*fertility factor*), придающая микроорганизмам донорные свойства, или R, определяющая резистентность клеток к антибиотикам [10, 11]. Способность автономной репликации плазмид обеспечивается наличием сайта инициации репликации (*ori*) и набором генов, кодирующих необходимые белки. Плазмиды содержат лишь часть необходимых для собственной репликации ферментов, используя также компоненты репликационного аппарата клетки-хозяина. Специфичностью *ori* – сайта определяется группная совместимость плазмид: разные плазмиды с одинаковым *ori* – сайтом не могут сосуществовать в одной клетке [12]. Многие плазмиды кодируют и собственные инициаторные белки, специфически распознающие *ori* – сайты. Это снижает зависимость плазмиды от клетки-хозяина и расширяет спектр возможных хозяев, что способствует межвидовому переносу генетического материала. Плазмиды могут содержать несколько *ori* – сайтов, функционирующих в разных организмах-хозяевах или в одном штамме, но в разных условиях. Некоторые плазмиды могут интегрироваться в хромосому клетки-хозяина и реплицироваться в ее составе в виде эписомы. Число копий плазмид в клетке может варьироваться в широких пределах, от одной до

нескольких сот копий на хромосому, но во всех случаях их количество регулируется, поскольку неограниченная репликация плазмидной ДНК привела бы к гибели клетки [13].

Геномы прокариот являются динамичными структурами даже в пределах одного вида. И исходя из внутривидовой вариабельности геномов сложились представления о базовом и гибком вспомогательном наборе генов. Консервативный базовый набор включает гены так называемого «домашнего хозяйства», ответственные за информационные системы репликации, транскрипции, трансляции, ключевые пути метаболизма и формирования клеточных структур, определяющих видовую/родовую принадлежность. В категорию вспомогательных входят операционные гены, контролирующие разные процессы метаболизма и морфофизиологические признаки, обеспечивающие приспособленность к определенной экологической нише. Многие из таких генов локализованы в плазмидах, мобильных элементах, геномных островках, которые не обязательно присутствуют во всех штаммах одного вида [14].

Бактериальный нуклеоид содержит около 4 тыс. генов. Размеры бактериального нуклеоида у различных представителей варьируют от 3×10^8 до $2,5 \times 10^9$ Д.

1.3 Ген 16S рРНК

Для идентификации микроорганизмов наиболее широкое применение получил подход, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей гена, ответственного за синтез малой субъединицы 16S рибосомальной РНК (16S рРНК). Этот ген присутствует в геноме всех известных бактерий и архей, но отсутствует у вирусов и в ядерных хромосомах эукариот. Ген 16S рРНК есть также у эукариот в митохондриальной ДНК. Последовательность этого гена состоит из 9 гипервариабельных регионов, перемеживающихся консервативными последовательностями [15]. Консервативные участки можно

использовать для первого этапа полимеразной цепной реакции - присоединения праймеров к исследуемой нити ДНК, а переменные- для определения видов бактерий. Степень схожести видоспецифичных участков очень хорошо отражает эволюционное родство разных видов.

Ген 16S рРНК имеет важное значение для оценки эволюционного родства различных бактерий, поскольку эволюционирует медленно (скорость его изменения у различных бактерий-симбионтов составила 2-4% замен нуклеотидов в течение 60 млн.лет). Еще одним достоинством служит то, что он является мультикопийным, а это способствует его легкому обнаружению. Использование гена 16S рРНК позволяет легко ориентироваться на широкий спектр бактерий для классификации и филогенетического анализа[16].

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК известны для большого количества бактерий и представлены в свободном доступе в генетических базах данных. Выявленные последовательности изучаемых микроорганизмов сравнивают с присутствующими в базах данных и таким образом идентифицируют вид бактерий или объявляют ее принадлежащий к очередному некультивируемому виду. В последнее время идет интенсивный пересмотр старой, фенотипической классификации бактерий, основанной на плохо формализуемых критериях- от внешнего вида колоний до способности окрашиваться различными красителями. Новая систематика опирается на молекулярные критерии и только лишь от части повторяет фенотипическую.

1.4 Используемые образцы бактерий

1.4.1 Бактерии рода *Bacillus*

Бациллы (лат. *Bacillus*)- род аэробных или факультативно анаэробных, обитающих преимущественно в почве, гетеротрофных бактерий[17].
Отличительные особенности:

-представлены крупными прямыми палочками, положительно окрашивающимися по Граму,

- способны образовывать споры в аэробных условиях,
- продуцируют каталазу.

Единственным патогенным для человека видом выступает *Bacillus anthracis* (палочка сибирской язвы), некоторые условно-патогенные виды также способны вызывать пищевые интоксикации и госпитальные инфекции, например, *Bacillus cereus* вызывает ряд оппортунистических инфекций (осложняющих другие заболевания) - чаще всего мастит у коров, образование абцессов, септицемию, эндокардиты, а также инфекции уха, глаз и ран. Самое распространенное заболевание, вызываемое *B. cereus* - отравление, связанное с потреблением пищи.

Бациллы выделяют из почвы, пресной и морской воды, а также с растений. Они могут расти в интервале температур от 5°C до 75°C, а их выживанию в экстремальных условиях способствует спорообразование [18].

Споры устойчивы к воздействию проникающей радиации, ультразвука, гидростатического давления, замораживания, нагревания, разрежения и др. Устойчивость спор к щелочам и кислотам во многом зависит от их принадлежности к различным видам. Споры некоторых культур бактерий остаются жизнеспособными даже при кипячении в концентрированной соляной кислоте в течение 20 минут. При этом резистентность спор во много раз повышается при их обезвоживании [19].

Изучено более 50 видов бактерий в пределах рода *Bacillus*, границы между которыми определяются на основании ограниченного количества тестов, оценивающих культурально-морфологические и биохимические свойства, и не являются установленными окончательно. Значительное межвидовое разнообразие свидетельствует о сложности в дифференцировке бацилл [20].

До 1991 года в род *Bacillus* входило большое количество весьма несхожих видов, как на генотипическом уровне (процент ГЦ пар колебался от вида к виду в пределах от 32 % до 69 %), так и на уровне фенотипа. Сравнения нуклеотидных последовательностей 16S рРНК 51 вида выявило по крайней мере 5 филогенетических групп.

По изученности генетики и физиологии *B.subtilis* занимает второе место после *E.coli*.

Род *Bacillus*- это одна из наиболее разнообразных и коммерчески полезных групп микроорганизмов.

В настоящее время штаммы *Bacillus* используют для получения:

- ферментов,
- антибиотиков,
- высокоочищенных биопрепаратов, включая усилители запаха и пищевые добавки,
- инсектицидов.

Изучение *Bacillus* ведется в различных отраслях, начиная от пищевой промышленности и заканчивая биотехнологией и генной инженерией[21].

1.4.2 Бактерии рода *Arthrobacter*

Arthrobacter- род бактерий, относящийся к семейству *Micrococcaceae*. Представлен палочковидными грамм-положительными бактериями неправильной формы и варьирующих размеров 0,8-1,2×1,0–8,0 мкм. Представители некоторых видов подвижны за счет наличия жгутиков. Это некислоустойчивые, неспорообразующие бактерии. Оптимальная температура для роста 25-30°C.

В молодых культурах палочки имеют V-образную форму с булавовидными концами. По мере роста культуры палочки распадаются на небольшие кокки диаметром около 1 мкм, располагающиеся одиночно, парами или в скоплениях неправильной формы.

Представители данного рода являются облигатными аэробами, хемоорганотрофами. Это одна из основных групп микроорганизмов, обитающих в различных типах почв. Их также обнаруживают в пресной и морской воде, в мерзлых грунтах, торфе, кишечном тракте животных. Обладая достаточно широким набором ферментов, артробактерии активно участвуют в

круговороте веществ в природе, осуществляя процессы нитрификации и аммонификации, фиксации атмосферного азота и превращения труднодоступных для других микроорганизмов веществ: углеводов, пластмасс, алкалоидов, лигнина, пестицидов и др.

Промышленное производство большинства хозяйственно ценных веществ, включая энзимы, пептиды, витамины, основаны на использовании в качестве продуентов бактерий рода *Arthrobacter*. В медицинской промышленности иммобилизованные микробные клетки, например *Arthrobacterglobiformis*, применяют при производстве стероидных гормонов.

Насовременном этапе развития науки для радикального повышения продуктивности коммерческих штаммов, определяющего рентабельность микробиологических процессов, всё чаще применяются генетические методы работы с данными штаммами, в частности, широко используются технологии рекомбинантных ДНК и рестрикционный анализ[22]. Некоторые эндонуклеазы рестрикции, например Alu I, AoxI, Asi372I были выделены из представителей рода *Arthrobacter*. В настоящее время работы по поиску новых продуентов рестриктаз продолжают. Так, недавно была выделена новая эндонуклеаза рестрикции AluVI из *Arthrobacter luteus* В - изошизомер AluI, нечувствительный к присутствию 5-метилцитозина в сайте узнавания AGCT[23].

Род *Arthrobacter* относится к группе нефтеокисляющих микроорганизмов, что делает его важным объектом экологической микробиологии. С использованием представителей данного рода создаются биопрепараты для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов [24, 25].

1.4.3 Бактерии рода *Achromobacter*

Achromobacter – род бактерий относящийся к семейству *Alcaligenaceae*. Представлен палочковидными грамм-отрицательными бактериями. Клетки подвижны за счет наличия жгутиков. Широко

распространены в природе и являются типичными аэробными гетеротрофами. Встречаются в воде (пресной и морской), почве, многие виды являются обитателями ризосферы. В настоящее время род *Achromobacter* насчитывает 16 видов [26].

Представители данного рода способны к разложению органофосфонатов, что обеспечивает возможность проведения биоремедиации почв загрязненных различными ксенобиотиками[27]. Например, было показано, что штамм *Achromobacter sp.* ВКМ В-2534 Д, выделенный из почвы, загрязненной глифосатом утилизирует органофосфонаты: метилфосфонат, аминометилфосфонат, глифосат, фосфоацетат. Органофосфонаты входят в состав гербицидов. Способ биоремедиации, включающий внесение данного штамма в почву обеспечивает высокую эффективность очистки [28].

1.4.4 Бактерии рода *Rhodococcus*

Бактерии рода *Rhodococcus*, относящиеся к семейству *Nocardiaceae*—это неподвижные, грам-положительные аэробы. Клетки палочковидные, длиной до 12, иногда 18 мкм., слабоветвящиеся, неподвижные. Спор не образуют. Обитают в почве, сточных водах и многих других экосистемах. Некоторые виды являются условно-патогенными для животных и человека[29, 30].

Отдельные представители данного рода способны использовать в качестве единственного источника углерода широкий спектр органических веществ, в том числе углеводороды, опасные с точки зрения экологии, в связи с этим их изучение имеет важное значение. Родококки обладают способностью окислять высокомолекулярные n-алканы и сложные хлорорганические соединения, которые трудно поддаются биодegradации.

Представители рода *Rhodococcus* синтезируют биосуфрактанты – поверхностно активные вещества биологической природы. Они представляют собой гликолипиды, включая трегалолипиды, которые эффективно снижают

поверхностное натяжение среды и имеют высокую эмульгирующую активность. Они так же способны утилизировать толуол, нафталин, бензол, гербициды. Отдельные штаммы используются в производстве биопрепаратов, применяемых для биоремедиации при нефтяных загрязнениях. Так же родококки используют в качестве продуцентов незаменимых аминокислот [31, 32].

1.4.5 Бактерии рода *Nocardia*

Nocardia- род бактерий, относящийся к семейству *Nocardiaceae*. Это неподвижные, грамположительные, слабокислотоустойчивые аэробы. Капсул и спор не образуют. Имеют сходство с клетками грибов. Диаметр нитей 0,3-1,3 мкм. С возрастом в нитях образуются перегородки и мицелий фрагментируется: образуются палочковидные и кокковидные формы. Патогенность для человека не высокая. Представители данного рода широко распространены в природе, особенно в почве, богатой органическими веществами.

В современной литературе бактерии рода *Nocardia* рассматривают как продуцентов:

1. Поверхностно активных веществ (ПАВ) [33]. Так, *Nocardia sp.* L-417 способна синтезировать ПАВ на гидрофобных субстратах. По химической природе ПАВ этого штамма представлены смесью жирных кислот, которые снижают поверхностное натяжение воды и проявляют высокую эмульгирующую активность [34].

2. Веществ с антимикробной активностью. Одной из глобальных проблем современности является возникновение мультирезистентных форм патогенных микроорганизмов, устойчивых к большинству используемых на практике антибиотических веществ. Актуальным является поиск современных эффективных антимикробных соединений. Было показано, что штамм *Nocardia levis* МК-VL 113 синтезирует соединения бис (2-этилгексил) -фталат и бис (5-этилгептил) –фталат, которым присуще антимикробное действие в отношении ряда бактерий, дрожжей и грибов [35]. Штамм *Nocardia*

pseudobrasiliensis IFM 0757, синтезирует антибиотик нокардитиацин, который обладает высокоэффективным действием против *Mycobacterium tuberculosis*[36].

3. Веществ, способных к подавлению развития клеток злокачественных опухолей[37, 38, 39]. Так, было показано, что штамм *Nocardia brasiliensis* IFM 0667 продуцирует нокарацины А, В, С и бразилихинон D. Нокарацинам было присуще цитотоксическое действие *in vitro* по отношению к клеткам промиелоцитарного лейкоза человека HL-60, а бразилихинону D – по отношению к клеткам лейкоза мышей L1210 и раку кожи людей[40].

Некоторые представители данного рода способны утилизировать нефть и компоненты гумуса. Нокардии обладают значительным биотехнологическим потенциалом, что делает возможным использование их в промышленности, экологической и медицинских отраслях[41].

1.4.6 Бактерии рода *Micrococcus*

Micrococcus – род маленьких, грамположительных бактерий семейства *Micrococcaceae*. Имеют форму сферы от 0,5 до 3 мкм в диаметре. Располагаются по одиночке или в виде неправильных скопления, не образуют длинных цепочек, у некоторых видов наблюдаются подвижные клетки [42]. На плотных питательных средах образуют колонии желтого, белого или красного цвета. Микрококки – облигатные аэробы, сапрофиты или факультативные паразиты, патогенных видов нет. Обычно неподвижны и не образуют эндоспор. Запасным веществом служит гликоген. У большинства видов оптимум температурного роста составляет 25-30⁰С. Многие виды могут развиваться при 5-8⁰С. Большинство микрококков устойчивы к высушиванию и нагреванию. Представители данного рода могут быть обнаружены на коже, в ротовой полости, в дыхательных путях человека и животных. В природе распространены повсеместно- в почве, воде, воздухе, пищевых продуктах [43]. В настоящее время род *Micrococcus* насчитывает 11 видов.

1.4.7 Бактерии рода *Pseudomonas*

Pseudomonas – род бактерий, относящийся к семейству *Pseudomonodaceae*. Представляют собой прямые или слегка изогнутые палочки, средние размеры 0,5-1,0×1,5-5,0 мкм. Отрицательно окрашиваются по Граму, спор и выростов не образуют, подвижны, имеют полярно расположенные жгутики. Большинство представителей рода *Pseudomonas* обладает гетеротрофным типом обмена веществ, т. е. для построения тела им требуется готовое органическое вещество. Биосинтетические процессы при этом осуществляются за счет обмена окислительного типа, где кислород служит конечным акцептором электронов, перенос которых связан с системой цитохромов. Псевдомонады широко распространены в природе, их можно встретить в почве, воздухе, морских и пресных водоемах, иле, нефти. Так же они были обнаружены на пищевых продуктах, телах животных, растениях.

Среди представителей данного рода имеются виды, способные к продукции витаминов и коферментов, аминокислот, органических кислот: глюконовой, 2-кетоглюконовой, α -кетоглутаровой и пировиноградной, полисахаридов, поверхностно-активных веществ, антибиотиков и многих других биологически активных соединений [44, 45].

Не так давно из бактерий рода *Pseudomonas* были выделены новые, своеобразные по структуре и спектру действия антибиотические вещества, в том числе монобактамы, псевдомоновые кислоты, аминогликозиды, эффективные в отношении антибиотико-резистентных возбудителей заболеваний. Так же представителей данного рода используют в качестве средства биологической борьбы с бактериальными и грибными заболеваниями сельскохозяйственных культур [46].

1.4.8 Бактерии рода *Agrobacterium*

Agrobacterium- род грамотрицательных бактерий, впервые выделенный как самостоятельный род Г. Дж. Конном в 1942 году. Представители данного рода являются хемоорганогетеротрофами, облигатными аэробами. Они не требуют специфических факторов для роста на искусственных питательных средах и способны использовать относительно большой спектр органических веществ как единственный источник углерода. Патоген растет при 0-37⁰С. Оптимальная температура роста 25-30⁰С. Представители данного рода способны к горизонтальному переносу генов, при помощи которого вызывают опухоли у растений.

Agrobacterium tumefaciens – один из наиболее изученных видов. Это аэробная палочковидная почвенная бактерия, способная к трансформации клеток растений при помощи специальной плазмиды. Служит фитопатогеном, при заражении растений происходит аномальная клеточная пролиферация, которая приводит к образованию корончатых галлов. Также известна условная патогенность у людей страдающих иммунодефицитными заболеваниями. Широко используется в генной инженерии для трансформации растений[47].

Род *Agrobacterium* гетерогенен по своему составу. В 1998 году была проведена реклассификация, в результате которой всех представителей *Agrobacterium* разделили на четыре новых рода: *Ahrensia*, *Pseudorhodobacter*, *Ruegeria* и *Stappia*. Однако, более поздние исследования 2001-2003 годов пришли к выводу, что большую часть видов следует причислить к роду *Rhizobium*.

1.5 Полимеразная цепная реакция

В 1983 г. американским биохимиком Кэри Муллисом был изобретен метод многократного копирования определённых фрагментов ДНК – полимеразная цепная реакция (ПЦР). Этот метод позволяет добиться значительного увеличения количества копий отдельных фрагментов молекул ДНК в реакционной смеси. Первая публикация о данном методе появилась в журнале Science в 1985 году [48], а в 1993 г. Кэри Муллис был удостоен за своё изобретение Нобелевской премии в области химии. Изначально метод ПЦР был разработан для повышения скорости и специфичности пренатальной диагностики серповидно-клеточной анемии, но сейчас он используется как в клинической диагностике, так и в фундаментальных исследованиях во многих областях биологических наук, в том числе, и в исследованиях, связанных с экологией микроорганизмов. Метод ПЦР обладает крайне высокой чувствительностью и теоретически позволяет обнаружить в пробе всего лишь одну молекулу ДНК, с тем, чтобы многократно ее копировать.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфической последовательности ДНК, осуществляемый *in vitro*. Копирование ДНК при ПЦР осуществляется специальным ферментом – ДНК полимеразой, как и в клетках живых организмов. ДНК полимеразы, двигаясь по одиночной цепи ДНК (матрице), синтезируют комплементарную ей последовательность на другой цепи. ДНК полимеразы не может начать синтез цепи ДНК *de novo*, ей необходима короткая затравочная цепь ДНК, к которой она может начать присоединять нуклеотиды. Основным принципом ПЦР состоит в том, что реакция полимеризации инициируется праймерами-короткими фрагментами затравочной ДНК в каждом из множества повторяющихся циклов.

Специфичность ПЦР определяется способностью праймеров узнавать строго определенный участок ДНК и связываться с ним согласно принципу молекулярной комплементарности. В обычной реакции ПЦР используется пара праймеров, которые ограничивают амплифицируемый участок с двух сторон, связываясь с противоположными цепями ДНК матрицы. Для многократного

увеличения количества копий исходной ДНК необходима цикличность реакции. Как правило, каждый из последовательно повторяющихся циклов ПЦР состоит из трех этапов:

1. Денатурации (плавления) ДНК, когда двухцепочечная молекула ДНК под воздействием высокой температуры переходит в одноцепочечное состояние;
2. Связывания (отжига) праймеров с матричной ДНК;
3. Элонгации, или удлинения цепи.

Смена этапов каждого цикла осуществляется за счет изменения температуры реакционной смеси. Сначала праймеры могут связаться только с определенной последовательностью исходной ДНК, но в последующих циклах они связываются с копиями этой последовательности, синтезированными в предыдущих циклах. Количество основного продукта ПЦР теоретически удваивается в каждом цикле, то есть растет с числом циклов экспоненциально [49].

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

-ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.

-Два праймера (затравки, необходимые для инициации синтеза ДНК), комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.

-Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК.

-Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

-Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.

-Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин [50].

Основное оборудование для проведения ПЦР – амплификатор.

Амплификатор – программируемый термостат, обеспечивающий периодическое нагревание и охлаждение пробирок, обычно с точностью не менее 0,1 °С. Амплификатор позволяет задавать сложные программы и обеспечивает возможность хранения копий искомой последовательности ДНК молекул при 4°С[51].

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий:

1. Горячий старт. ДНК нагревают до 92- 96°С в течение 3-х минут. Затем температуру понижают до 72°С, с целью добавления фермента. В последующие разы фермент не добавляют, т.к. используется термостабильная ДНК полимеразы, способная кратковременно выдерживать высокие температуры.

2. Денатурация. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96°С (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимеразы) на 0,5—2 мин., чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями.

3.Отжиг. Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 4—5°С ниже температуры их плавления. Время стадии — 0,5—2 мин. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

4. Элонгация. ДНК-полимеразы реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Полимеразы начинают синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 °С. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную

стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7-10 мин [52].

Хранение возможно при температуре 4°C в течение 18 часов.

1.6 Термостабильные ДНК-полимеразы

ДНК-полимераза - фермент, синтезирующий цепи нуклеотидов из нуклеозидтрифосфатов. Они добавляют нуклеотиды к 3'-гидроксильной группе предыдущего нуклеотида в цепи ДНК, поэтому все полимеразы работают в направлении 5' - 3'. В процессе репликации зависимая ДНК-полимераза синтезирует копию исходной последовательности ДНК. Точность очень важна в этом процессе, так как ошибки в полимеризации приведут к мутациям, поэтому используемые полимеразы обладают способностью к «редактированию» — исправлению ошибок. Первоначально для осуществления ПЦР использовали обычные ДНК полимеразы, которые подвергались температурной инактивации в каждом цикле на этапе денатурации ДНК. Полимеразу приходилось многократно добавлять в реакционную смесь, что было достаточно трудоемко и не позволяло автоматизировать процесс. В настоящее время в реакции используются термостабильные ДНК полимеразы, выдерживающие высокую температуру на всех этапах цикла ПЦР в течение нескольких десятков циклов. Количество коммерчески доступных термостабильных ДНК полимераз, отличающихся некоторыми своими свойствами, достаточно велико [53]. Наиболее часто используется Taq полимеразы, первоначально выделенная из термофильного микроорганизма *Thermus aquaticus*, температурный оптимум работы которой находится в области 70-72°C. В подавляющем большинстве случаев ампликоны длиной до 4-6 тыс. пар нуклеотидов получают с использованием именно Taq ДНК-полимеразы. Вероятность неточного включения нуклеотида при этом находится на уровне 0,01-0,001 %. Vent ДНК-полимеразу (а также другие ДНК-полимеразы, отличающиеся наличием так называемой корректирующей активности, например, Pwo, Pfu, Tgo, Ulma) применяют для достижения более

точного копирования а также для получения продуктов длиной порядка 10 тыс. пар нуклеотидов (как в случае с TaqSE ДНК-полимеразой). И все же на сегодняшний день уровень ошибки ДНК-полимераз менее 0,00001% остается недостижимым. Современные коммерческие препараты термостабильных полимераз обеспечивают, как правило, стабильную воспроизводимую активность, что позволяет использовать технологию ПЦР в стандартной лабораторной практике [54].

1.7 Электрофорез

Электрофорез - биохимический метод, используемый для разделения молекул ДНК по размерам. Чтобы разделить молекулы ДНК, исходя из их размеров, электрофорез проводят в гелях.

Поскольку поры в полиакриламидном геле для больших молекул ДНК слишком малы, то для разделения молекул ДНК по размеру были разработаны специальные гели на основе агарозы (полисахарид, получаемый из водорослей). Оба эти метода разделения ДНК широко используются для аналитических и препаративных целей [55].

Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод, используемый для идентификации, разделения и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами. Кроме того, при разделении в геле прямо следят за положением ДНК, так как полосы ДНК в геле можно окрашивать флуоресцирующим в ДНК красителем – бромистым этидием в низкой концентрации. Просматривая прокрашенный гель в ультрафиолетовом свете, можно заметить даже 1 нг ДНК

При проведении электрофореза используют трис-боратные, трис-ацетатные или трис-фосфатные буферы.

Скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяется следующими пятью главными параметрами:

- размером молекул ДНК,
- конформацией ДНК,
- концентрацией агарозы,
- напряженностью электрического поля,
- используемым буфером [56].

В основе электрофореза лежит движение заряженных частиц под действием электрического поля. Молекулы ДНК обладают отрицательным зарядом, поэтому они способны двигаться к положительному электроду под действием электрического поля.

Электрофорез является одним из методов определения количества и качества ДНК. Он позволяет определить приблизительную концентрацию ДНК. Это осуществляется за счет сравнения исследуемой ДНК со стандартными разведениями ДНК-маркера известной молекулярной массы, концентрация которого известна. После электрофореза и окрашивания геля сравнивают интенсивность свечения полос ДНК в исследуемых и эталонных образцах.

1.8 Эндонуклеазы рестрикции

Первые рестрикционные эндонуклеазы были выделены в 1968г. из штаммов *E. Coli*B и *E. Coli*K. В настоящее время выделено более четырех тысяч этих ферментов.

Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы (от лат. *restrictio* — ограничение)- это ферменты, относящиеся к третьему классу— классу гидролаз, которые катализируют реакцию гидролиза фосфодиэфирных связей чужеродных ДНК в большинстве прокариотических и некоторых других организмах и выполняющие тем самым "иммунную" функцию. Рестриктазы — являются частью сложной системы рестрикции-модификации, используемой бактериями для защиты резидентной ДНК от загрязнения последовательностями чужеродного происхождения. Эти энзимы узнают

определенные последовательности в двухцепочечной ДНК. Выделяют их преимущественно из прокариотических клеток [57].

В отличие от экзонуклеаз, рестриктазы расщепляют нуклеиновые кислоты не с конца молекулы, а в середине. При этом каждая рестриктаза узнает определенный участок ДНК длиной от четырех пар нуклеотидов и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне его.

Выделяют 3 основных класса ферментов рестрикции, сайты узнавания для которых могут быть симметричными или несимметричными.

1. Рестриктазы первого класса, например, EcoK из *Escherichiacoli*K12, узнают определенную последовательность нуклеотидов и разрезают двухцепочечную молекулу ДНК неподалеку от этой последовательности в произвольной точке, само место разреза не является строго специфичным.

2. Рестриктазы второго класса, например, EcoRI, узнают определенную последовательность и расщепляют двойную спираль ДНК в определенной фиксированной точке внутри этой последовательности. Рестриктазы этого класса узнают палиндромные последовательности.

3. Рестриктазы третьего класса, например, EcoPI, узнают нужную последовательность и разрезают двухцепочечную молекулу ДНК, отступив определенное число нуклеотидных пар от ее конца(или в нескольких точках на разном удалении от сайта узнавания). При этом образуются фрагменты ДНК с ровными (тупыми) концами или с выступающими (липкими) 5'- или 3'-концами. Эти рестриктазы узнают асимметричные сайты [58].

В подавляющем большинстве в биотехнологии используют рестриктазы 2-го типа. Энзимы этого типа состоят из двух отдельных белков: рестрикцирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы. Они нуждаются в ионах магния в качестве кофакторов.

На данный момент выделено более 500 рестриктаз второго класса, однако среди энзимов, выделенных из различных микроорганизмов, встречаются такие, которые узнают на ДНК одни и те же последовательности. Такие пары называют изошизомерами.

Большинство рестриктаз второго класса специфически узнают на ДНК тетра- и гексануклеотидные последовательности. Поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупнощеплящие. Чем короче олигонуклеотидная последовательность сайта рестрикции, узнаваемого рестриктазой, тем чаще он встречается в случайной последовательности нуклеотидов, в которой каждый из четырех нуклеотидов представлен с одинаковой частотой. Так, случайная тетрануклеотидная последовательность встречается в среднем через каждые 256 п.о., а гексануклеотидная через каждые 4096 п.о.[59].

Действующую в настоящее время номенклатуру названий рестриктаз предложили Смит и Натанс. Она основана на следующих правилах:

- Название рода и вида микроорганизма обозначается тремя латинскими буквами (например, *Escherichia coli*- Eco или *Bacillus stearothermophilus*- Bst);

- За родо-видовым названием следует обозначение штамма (EcoR, BstEN);

- Если штамм содержит несколько различных систем рестрикции–модификации, то они обозначаются римскими цифрами (Dra I, Dra III; BstEN I, BstEN II).

Основными характеристиками всех рестриктаз являются:

- Узнаваемая последовательность нуклеотидов;

- Место расщепления;

- Зависимость активности от наличия метилированных оснований в пределах узнаваемой последовательности [60].

Эндонуклеазы рестрикции выделяют из биомассы штаммов-продуцентов путем многостадийной колончатой хроматографии клеточного экстракта, пользуясь различными сорбентами. Процедура выделения достаточно сложна и чувствительна ко многим внешним факторам.

Полученный чистый белок концентрируют, тестируют и хранят в 50% растворе глицерина. Чистые препараты рестриктаз теряют активность при комнатной температуре, поэтому их необходимо хранить при температуре не

выше -18°C , а транспортировать и использовать в лабораторных условиях только во льду.

Ферменты рестрикции являются эффективным инструментом исследования. Они позволяют превращать молекулы ДНК больших размеров в набор фрагментов длиной от нескольких сотен до нескольких тысяч оснований. С помощью метода электрофореза в агарозном геле фрагменты ДНК, различающиеся по размеру, можно легко разделить, а затем исследовать каждый фрагмент отдельно.

Короткие фрагменты мигрируют намного быстрее, нежели длинные. При сравнительно высокой концентрации агарозы большие фрагменты не могут проникнуть в гель. В процессе миграции рестрикционные фрагменты не деградируют, их можно вымывать в виде биологически активных двуцепочечных молекул. При окрашивании гелей красителями, связывающимися с ДНК, выявляется набор полос, каждая из которых отвечает рестрикционному фрагменту, молекулярную массу которого можно определить, проведя калибровку с помощью ДНК с известными молекулярными массами [61].

Для каждого фермента рестрикции существуют оптимальные условия реакции, которые приводятся в описании, прилагаемом фирмой-изготовителем. Основными переменными параметрами служат температура инкубации и состав буфера.

Сохранение активности и специфичности гидролиза большинства ферментов не превышает одного года[62].

1.8.1 BstMBI

Оптимальная температура инкубации 65°C , рекомендуемый буфер – O. Сайт узнавания - $\uparrow\text{GATC/CTAG}\downarrow$. Выделяют из штамма *Bacillus stearothermophilus MB*.

1.8.2HaeIII

Оптимальная температура инкубации 37°C, рекомендуемый буфер – G.
Сайт узнавания – GG↑CC/CC↓GG. Выделяют ее из штамма *E. Coli* несущего клонированный ген HaeIII из *Haemophilusaegyptius*.

1.8.3RsaI

Оптимальная температура инкубации 37°C, рекомендуемый буфер – B.
Сайт узнавания – GT↑AC/CA↓TG.
Выделяют из микроорганизма *Rhodopseudomonassphaeroides*.

1.8.4MspI

Оптимальная температура инкубации 37°C, рекомендуемый буфер – B.
Сайт узнавания – C↑CGG/GGC↓C. Получают ее из микроорганизма *Moraxella species*.

1.8.5FatI

Оптимальная температура инкубации равна 55 °C. рекомендуемый буфер- G. Сайт узнавания- ↑CATG/GTAC↓. Выделяют ее из штамма *E.coli*, несущего клонированный ген FatI из *FlavobacteriumaquatileNL3*.

1.8.6Tru9 I

Оптимальная температура инкубации равна 65 °C, рекомендуемый буфер – W. Сайт узнавания- T↑TAA/AAT↓T. Выделяют ее из штамма *E. coli*, несущего клонированный ген Tru9 I из *Thermus ruber 9*.

Рестриктазы, наряду с их значимостью для научных экспериментов, имеют огромное практическое значение, поскольку являются незаменимым

инструментом молекулярных генетиков при выполнении диагностических исследований.

Благодаря своим свойствам, каждая рестриктаза узнает свой строго специфичный сайт. При использовании для рестрикции нескольких эндонуклеаз и последующего анализа электрофоретических картин гидролиза можно добиться полного упорядочивания расположения сайтов рестрикции друг относительно друга и создавать таким образом карты исследуемых участков ДНК. Такая информация в дальнейшем используется для выявления различного рода мутаций. Если в структуре любого из сайтов произойдет изменение (мутация) даже одного нуклеотида, то этот сайт не будет узнаваться рестриктазой и расщепляться, вследствие чего картина гидролиза на электрофорезе изменится. Помимо "исчезновения" сайта узнавания для определенных рестриктаз, в некоторых случаях вследствие мутации в гене может возникнуть дополнительный сайт, что позволяет легко идентифицировать такую мутацию при проведении гидролиза продукта ПЦР и последующего гель-электрофореза реакционной смеси [63].

1.8.7 Звездчатая активность рестриктаз

При неоптимальных условиях реакции, некоторые ферменты рестрикции способны к расщеплению последовательностей, которые похожи, но не идентичны заявленной производителем последовательности. Такая измененная последовательность называется Star – активность. Проявляется при определенных условиях проведения реакции:

- использование избытка рестриктаз,
- изменение pH и ионной силы инкубационной среды,
- замена ионов Mg^{2+} на некоторые другие ионы двухвалентных металлов,
- добавление органических растворителей (глицерин, диметилсульфоксид, этанол и др.).

При проведении электрофореза это приводит к появлению «шмера» (шмер – размазанная туманная полоска ДНК, идет от старта до финиша) вместо четких полос в геле или к появлению новых полос [64].

1.9 Метод полиморфизма длин рестриционных фрагментов

Традиционный способ идентификации бактерий основан на широком спектре фенотипических характеристик. Организмы разделяли на группы на основе морфологических и физиологических признаков: потребности в питании, условиях роста и многое другое. В настоящее время данные признаки стали одинаковыми для многих видов и утратили свою уникальность.

Новым шагом в бактериальной систематике стала расшифровка последовательности гена 16SpPHK. Благодаря своей консервативной природе и простоте манипулирования, ген 16SpPHK широко используется для идентификации различных видов бактерий.

ПДРФ – это способ исследования геномной ДНК, путем разрезания ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции [65]. Полиморфные последовательности, которые образуются в результате ПДРФ, используются в качестве маркеров на генетических картах сцепления. Полиморфизм, обычно, вызывается мутацией в участке расщепления, или может быть связан с внедрением мобильного элемента между сайтами рестрикции. Все изменения в первичной структуре ДНК ведут к изменениям в длине фрагментов, образующихся под воздействием рестриктаз.

Анализ ПДРФ используется для определения риска заболевания, построения генетических карт родства. Полное совпадение рестриционных картин по нескольким рестриктазам указывает на близкородственность исследуемых штаммов [66].

1.10 Анализ *insilico*

in

silico

-

термин, обозначающий компьютерную симуляцию эксперимента, чаще биологического. Фраза была создана по аналогии с фразами *in vivo* (в живом организме) и *in vitro* (в пробирке), которые часто используются в биологии.

С помощью компьютерного моделирования анализируют нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности, производят выравнивание последовательностей, поиск гомологичных последовательностей ДНК, РНК и белков, построение филогенетических карт, используя специальное программное обеспечение. Осуществляют такие манипуляции как: теоретическую амплификацию, рестриктирование, электрофорез. Геномы могут иметь длину до нескольких миллиардов пар нуклеотидов. Данный метод позволяет анализировать различные геномы за короткое время, осуществлять поиск нужных последовательностей ДНК, РНК, белков и работать с ними [67].

На данный момент имеется огромное количество генетических данных, находящихся в открытом доступе на специализированных порталах. Математическая, аналитическая и программная обработка данных последовательностей имеет явное преимущество перед экспериментальными исследованиями в области трудоемкости, стоимости и времени [68].

Применение биоинформационного подхода позволяет планировать и моделировать эксперименты для того чтобы снизить вероятность ошибки в ходе практического эксперимента, а также снизить количество ресурсов.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты идентификации

Образцы биомассы бактерий были любезно предоставлены Ольгой Кондратенко, магистром кафедры биотехнологии, из группы индийского исследователя Саеда Бакера.

2.2 Методика выделения ДНК

Методика выделения ДНК для ПЦР (пробоподготовка) с помощью набора реагентов SILICAuni основана на сорбции преимущественно высокомолекулярной фракции нуклеиновых кислот суспендированными частицами оксида кремния («стеклянное молоко», «glassmilk», SiO₂), что позволяет производить пробоподготовку с минимальными потерями, и обуславливает качество полученного препарата ДНК, оптимальное для ПЦР. Основным компонентом лизирующей смеси – гуанидинтиоцианат. Продолжительность пробоподготовки с помощью SILICAuni составляет около 1 часа. Препараты ДНК, полученные с помощью SILICAuni, можно сразу использовать для ПЦР без определения концентрации ДНК в них и дополнительного разбавления.

Реактивы:

- Лизирующий раствор,
- Отмывочный раствор №1,
- Отмывочный раствор №2,
- Элюирующий раствор,
- Сорбент (водная суспензия).

Ход реакции:

1. Исследуемую пробу, содержащую ДНК, внести в микропробирку.
2. Добавить в пробирку 300 мкл лизирующего раствора (если есть осадок, то предварительно его необходимо перемешать).

- 3.Перемешать содержимое пробирки и поместить в термостат на 10 мин.
- 4.Встряхнуть содержимое пробирки на вортексе и центрифугировать 10 мин. при 13,4 тыс. об./мин.
- 5.С помощью автоматического дозатора отобрать надосадочную жидкость и перенести в чистую пробирку. Затем добавить 20 мкл суспензии сорбента. Перед использованием сорбента, его следует полностью суспендировать на вортексе до исчезновения осадка.
- 6.Содержимое пробирки с пробой встряхнуть на вортексе и оставить в штативе на 10 мин. для адсорбции ДНК, в течение которых каждые 3 минуты перемешивать для поддержания частиц сорбента во взвешенном состоянии.
- 7.Пробирки центрифугировать 20 сек. при 13,4 тыс. об./мин.
- 8.Надосадочную жидкость удалить при помощи автоматического дозатора.
- 9.К осадку прибавить 500 мкл рабочего отмывочного раствора №1, осадок ресуспендировать, встряхнуть на вортексе.
- 10.Центрифугировать пробы 30 сек. при 2 тыс. об./мин.
- 11.Надосадочную жидкость удалить.
- 12.К осадку прибавить 500 мкл рабочего отмывочного раствора №2, осадок ресуспендировать, встряхнуть на вортексе.
- 13.Центрифугировать пробы 30 сек. при 2 тыс. об./мин.
- 14.Надосадочную жидкость полностью удалить.
- 15.Повторить операции, изложенные в пп.12 ,13 и 14.
16. Открытую пробирку поместить в термостат и сушить осадок 5 мин. при 65°C.
17. К высушенному осадку добавить 75 мкл элюирующего раствора, пробирку закрыть и термостатировать 1-2 мин. при 65°C.
18. Пробирку встряхнуть на вортексе для ресуспендирования осадка и термостатировать в прежних условиях еще 5 мин. По окончании термостатирования содержимое пробирки еще раз встряхнуть на вортексе.

19. Центрифугировать 1 мин. при 10 тыс. об./мин. Надосадочную жидкость (препарат ДНК) перенести в чистую пробирку, не задевая при этом осадка. Препарат ДНК непосредственно используется для проведения ПЦР.

Хранить препараты ДНК рекомендуется при температуре 2-8°C не более 2 недель или до 6 месяцев при -18 °С, не допуская частого замораживания-оттаивания [69].

2.3 Методика проведения электрофореза

Необходимое оборудование для проведения и документирования электрофореза:

1. Источник питания Bio-RadPowerPacHV (1-400 Вт, 0,01-500мА, 20-5000В).
2. Камера для горизонтального электрофореза (гель 7x10) Mini-SubCellGT, Bio-Rad.
3. Гель - документирующая система Bio-RadGelDocXR с компьютером.

Реактивы, необходимые для проведения электрофореза:

1. Порошок агарозы;
2. Бромистый этидий;
3. Буферы для электрофореза (трис-ацетатные, трис-боратные, трис-фосфатные);
4. Днк-маркеры;
5. 6-тикратный буфер для нанесения (ксиленцианол FF, метиленовый синий, сахараза и вода).

Ход реакции:

1. Взвесить агарозу и добавить ее к соответствующему количеству 0.5x TAE буфера.
2. Поместить в работающую микроволновую печь на 45-50 сек., до получения однородной суспензии, затем остудить до 60⁰ С.
3. Установить гребенку в форму для агарозы (форму выровнять по уровню, для равномерного нанесения раствора).

4. Перелить раствор в форму для агарозы.
5. Оставить гель на 25 минут для застывания.
6. Удалить гребенку и поместить гель в электрофоретическую кювету.
7. Покрыть гель слоем электрофоретического буфера (гель должен быть покрыт буфером, толщина которого 1см).
8. Смешать пробы ДНК с буфером для нанесения, содержащим глицерин и красители, в соотношении 5:1. Внести смесь в лунки геля под электрофоретический буфер с помощью автоматического дозатора. Нанести маркер (в первую и последнюю лунки).
9. Подсоединить электроды, установить напряжение и время, запустить электрофорез.
10. Сверху положить хладоген.
11. После окончания электрофореза достать гель и погрузить его в бромистый этидий для окрашивания и поставить на вортекс, на 25 минут.
12. Промыть гель дистиллированной водой.
13. Окрашенный гель поместить в трансиллюминатор.
14. Рассмотреть гель в ультрафиолетовом свете и документировать полученные изображения.

2.4 Методика проведения ПЦР

Реакция ПЦР проводилась в приборе ThermalCycler C1000.

На одну пробу объемом 50мкл требуется:

- 32 мкл. дист. воды,
- 5 мкл. 10x буфера,
- 5 мкл. dNTPs,
- 3 мкл. MgCl₂,
- 1 мкл. +1 мкл. праймеров с концентрациями по 1μM (8F – 1492L),
- 1 мкл. HotStartPolymeras (Taq - полимеразы).

Все вещества смешивали в 1 пробирке объемом 1,5 мл из расчета на 31 пробу, затем в каждую было добавлено по 48 мкл.данной смеси и по 2 мкл. исследуемой ДНК.

Для визуализации результатов амплификации использовали электрофорез. После окончания электрофореза гель помещали в транслюминатор гель-документирующей системы. Проведенный электрофорез ампликонов ДНК показал, что реакция ПЦР прошла успешно и мы смогли выделить участки ДНК гена 16S рРНК длиной 1500 пар оснований.

При проведении ПЦР использовали следующую программу:

1. 95⁰C – 5:00 мин.
2. 95⁰C – 0:15 сек
3. 56⁰C – 0:20 сек.
4. 72⁰C – 1:36 сек.
5. Goto 2:35 times
6. 72⁰Cfor 7: 00 мин.
7. 4⁰C – 18:00:00

2.5 Проведение реакции рестрикции

Перед проведением рестрикционного анализа ампликоны были очищены с помощью набора Diatom DNA Clean-UP. Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 2 ч. в приборе Thermomixercomfort производство фирмы Eppendorf. Реакция проходила при 37⁰C (для рестриктазы NaeIII, RsaI, MspI); 65⁰C (для рестриктазы MboI, Tru9 I); 55⁰C (для рестриктазы FatI) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 ед. акт. рестриктазы.

Для постановки реакции рестрикции, на 1 пробу объемом 50 мкл необходимо:

- 22 мкл H₂O,
- 5,5 мкл 10x буфера,

- 3 мкл фермента (активность фермента 10 000 е.а/мл).

Все вещества смешали нахолоду в 1 пробирке объемом 2 мл, из расчета на 31 пробу, затем в каждую пробирку добавили по 30,5 мкл данной смеси и по 15 мкл исследуемой ДНК.

Для визуализации результатов рестрикции использовали электрофорез.

Все использованные нами рестриктазы имеют тетрануклеотидный сайт узнавания, что позволило получить от 3 до 7 фрагментов ДНК в результате расщепления продуктов амплификации, имеющих длину порядка 1500 пар нуклеотидов.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

п.о. - пары оснований

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

bp–basepairs

dNTPs – дезоксинуклеозид трифосфаты

kb – kilobass

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Волова, Т. Г. Введение в биотехнологию [Электронный ресурс] : электрон.учеб. пособие/ Т. Г. Волова. – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – Режим доступа: https://e.sfu-kras.ru/pluginfile.php/1299782/mod_resource/content/1/Введение%20в%20биотехнологию.УМКД.pdf.
2. Schlegel, L. Identification of Major Streptococcal Species by *rrn*-Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis / L.Schlegel [et.al] // *Journal of clinical microbiology*. - 2003 - V 41, I 2 - P. 657- 666.
3. Bustamante, C. Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics / C. Bustamante, Z. Bryant, S. B. Smith // *Nature*. — 2003. — V. 421, №6921. — P. 423-427.
4. Титова, Н. М. Биохимиямолекулярнаябиология [электронныйресурс]: конспектлекций / Н.М. Титова [идр.]- Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – Режим доступа: https://vk.Com/doc53902958_503910494?Nash=98728edd6cd5c8677d&dl=f2b6fb020e5cda4f38.
5. Лысак, В. В. Микробиология : учебное пособие / В. В. Лысак.- Минск : БГУ, 2007. – 430 с.
6. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – Москва :МГУ, 2004. – 448 с.
7. Шестаков, С. В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий / С. В. Шестаков // *Экологическая генетика*. – 2007.– Т. 5, № 2. – С. 12–24.
8. Boto, L. Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges / L. Boto // *Proc. Roy. Soc.*, 2010. - V. 277. - P. 819–827.
9. Shintani, M.Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy / M. Shintani, Z. Sanchez, K. Kimbara // *Frontiers In Microbiology*. – 2015. - V.6. – P. 242-243.

- 10.Квитко, К.В. Генетика микроорганизмов: учеб.пособие / К.В. Квитко, И.А. Захаров; под ред. А.В. Пиневича. 2-е изд. СПб.: Изд.дом СПб.ун-та, 2012.- 268 с.
- 11.Равин, Н.В.Геном Прокариот / Н.В. Равин, С.В. Шестаков // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т.17, №4. – С. 972-982.
- 12.Гигани, О. Б. Плазмиды: монография / О. Б.,Гигани, О.О. Гигани. — М.: РУСАЙНС, 2017. — 154 с.
- 13.Canchaya, С. Phage as agents of lateral gene transfer / С. Canchaya [et al.] //Current Opin. Microbiol. — 2003. — V. 6. — P. 417–424.
- 14.Смирнов, Г.Б. Механизмы приобретения и потери генетической информации бактериальными геномами / Г.Б., Смирнов // Усп.соврем. биологии. – 2008. - Т. 28, № 1. - С. 52–76.
- 15.Алексеева, А.Е. Возможности и перспективы применения методов массивного параллельного секвенирования в диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями / А.Е. Алексеева, Н.Ф.Бруснигина // электронный журнал МедиАль. –2014. - №2 (12). – С. 1-15.
- 16.Точилина, А.Г. Индикация и идентификация бактерий рода *Lactobacillus* с использованием полимеразной цепной реакции / Г. А. Точилина // Микробиология, эпидемиология и иммунобиология. – 2008. – № 3. – С. 69-73.
- 17.Прудникова, С.В. Микробиология: руководство для работ по малому практикуму / С.В. Прудникова, Ц.М. Гукасян, Н.И. Сарматова.- Красноярск: Издательский центр Красноярского государственного университета.- 2004.- 103с.
- 18.Поздеев, О.К. Медицинская микробиология: учебное пособие/ О.К. Поздеев.- 4-е изд.- Москва: ГЭОТАР- Медиа, 2010.-768с.
- 19.Жизнь растений. Бактерии и актиномицеты / Под ред. Н. А. Красильникова, А. А. Уранова. - Москва: Просвещение,1974. – Т.1. – 487 с.

20. Васильев, Д.А. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики: науч.изд. / Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013.– 98 с.
21. Садунова, А.В. Общая характеристика бактерий рода *Bacillus* / А. В. Садунова. – Владивосток: Дальневосточный федеральный университет, 2014. - 66 с.
22. Сапунова, Л.И. Получение рекомбинантных штаммов актинобактерий рода *Arthrobacter* / Л.И. Сапунова [и др.] // Генетика и биотехнология XXI века. Фундамент.и приклад. аспекты: мат-лы Междунар. науч. конф. – Минск: Изд. центр БГУ, 2008.
23. Чернухин, В.А. Новая эндонуклеаза рестрикции *AluV I* из *Arthrobacter luteus* В- изошизомер *AluI*, нечувствительный к присутствию 5-метилцитозина в сайте узнавания AGCT / В.А. Чернухин [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова. – 2007. – Т.3, №1. – С. 21-27.
24. Жегневская, Л. В. Биодegradация компонентов нефти и нефтепродуктов микроорганизмами : дис. ... канд. техн. наук : 03.00.23 / Жегневская Людмила Валерьевна. – Уфа, 1999. –112 с.
25. Пат. 2142996 Российская федерация, МПК 6С 12N 1/26 А, 6С 03F 3/34 В, 6В 09С 1/10В. Штамм *Arthrobacter* sp. для разложения сырой нефти и нефтепродуктов / С.А. Власов ; заявитель и патентообладатель Научно-техническое объединение «ИТИН»- № 99112143/13 ; заявл. 17.06.99 ; опубл 15.06.2001, Бюл. № 22. – 3 с.
26. Воронина, О. Л. Разнообразие и опасность *Achromobacter* spp., поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом / О. Л. Воронина [и др.]// Пульмонология. – 2015. - №25 (4). – С .389-401.
27. Pipke, R. Metabolism of glyphosate by an *Arthrobacter* sp. GLP-1 / R. Pipke [etal] // electronic journal Biochem. - 1987. - V.165. - P.267-273.
28. Пат. 2401298 Российская федерация, МПК С 12 N 1 20, В 09 С 1 10. Штамм бактерий *Achromobacter* sp.-деструктор органофосфонатов и

- способ его применения для биоремедиации почв / А. А. Леонтьевский ; заявитель и патентообладатель Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, пат.-лиц.- № 2009105432/10; заявл. 18.02.2009 ; опубл 2010.– 5 с.
- 29.Ившина, И. Б. Бактерии рода *Rhodococcus* (иммунодиагностика, детекция, биоразнообразие): дис. ... д-ра биол.наук: 14.00.36, 03.00.07 / Ившина Ирина Борисовна.- Пермь, 1997. – 150 с.
- 30.Лихошвай, А. В. Экология бактерий рода *Rhodococcus* из глубоководных битумных построекозера Байкал: дис. ... кандидата биол.наук: 03.02.08 / Александр ВикторовичЛихошвай.- Иркутск, 2011. – 137 с.
31. Лыонг, Т. М. Бактерии- нефтеструкторы рода *Rhodococcus* - потенциальные продуценты биосуфрантов / Т. М.Лыонг [и др.] // Известия вузов. – 2016. - №1(16). – С. 50-60.
32. Лыонг, Т. М. Структура и физико-химические свойства гликолипидных биосуфрантов, продуцируемых бактериями-нефтеструкторами *Rhodococcus* sp. x5 / Т. М. Лыонг [и др.] //Ивестия вузов. – 2017. - Т.7, №2. –С. 72-79.
33. Халдун, А.О. Испытание новой питательной среды при изучении экологии микроорганизмов родов *Nocardia* и *Rhodococcus*/ А.О. Халдун, Р.А Нуратинов // Научный журнал Юг России: экология, развитие. – 2008. – Т. 3, №4. – С. 125-129.
- 34.Kim, S. H., .Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417 / S. H. Kim [et.al] // *Biotechnol. Appl. Bio - chem.* — 2000. — V. 31, №3. — P. 249–253.
35. Kavitha, A. Production of bioactive metabolites by *Nocardia levis* MK-VL 113 / A. Kavitha [et.al]// *Lett. Appl. Microbiol.* — 2009. — V. 49, № 4. — P. 484–490.
- 36.Mukai, A. Nocardithiocin, a novel thiopeptide antibiotic, produced by pathogenic *Nocardia pseudobrasiliensis* IFM 0757 / A. Mukai[et.al]// *J. Antibiot.* — 2009. — V. 62, № 11. — P. 613–619.

37. Gao, X. A novel anticancer and antifungus phenazine derivative from a marine actinomycete BM-17 / X. Gao [et.al] // *Microbiol. Res.* — 2012. — V. 167, №10. — P. 616–622.
38. Seung, H. K. Nargenicin enhances 1,25-dihydroxyvitamin D₃- and all-trans retinoic acid-induced leukemia cell differentiation via PKC β I/MAPK pathways / H. K. Seung, J. C. Yoo, T. S. Kim // *Biochem. Pharmacol.* — 2009. — V. 77, №11. — P. 1694–1701.
39. Wyche, T. P. Peptidolipins B-F, antibacterial lipopeptides from an ascidian-derived *Nocardia* sp. / T. P. Wyche [et.al] // *J. Nat. Prod.* — 2012. — V. 75, №4. — P. 735–740.
40. Tsuda, M. Nocarasins A-C and brasiliquinone D, new metabolites from the actinomycete *Nocardia brasiliensis* / M. Tsuda [et.al] // *J. Nat. Prod.* — 1999. — V. 62, №7. — P. 1640–1642.
41. Пирог, Т. П. Бактеріюроду *Nocardia* як об'єкти біотехнології / Т. П. Пирог [ідр.] // *Biotechnologia acta.* — 2013. — V. 6, №3. — С. 23-35.
42. Бактерии рода *Micrococcus* [Электронный ресурс] — Режим доступа: <http://www.gastroscan.ru/handbook/118/7093>.
43. Микрококки [Электронный ресурс] — Режим доступа: <http://plantlife.ru/books/item/f00/s00/z0000032/st087.shtml>.
44. Эльхедми, А.Э. Характеристика бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из пищевых продуктов / А.Э. Эльхедми, Х. М. Элькаиб, В.Н. Леонтьев // *Труды БГТУ.* — 2015. — №4. — С. 251-255.
45. Бактерии рода *Pseudomonas* [Электронный ресурс] — Режим доступа: <http://plantlife.ru/books/item/f00/s00/z0000032/st031.shtml>.
46. Смирнов, В. В. Бактерии рода *Pseudomonas*: монография / В. В. Смирнов, Е. А. Киприанова. — Киев : Наук, думка, 1990. — 264 с.
47. *Agrobacterium tumefaciens* [Электронный ресурс] — Режим доступа: <http://mikrobiki.ru/nauka/klinicheski-vazhnye-bakterii/agrobacterium-tumefaciens.html/>

48. Saiki, R.K. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia/ R.K.Saiki, S. Scharf, M. Faloona // Science.- 1985.- № 20.-P. 1350-4.
49. Орадова, А.Ш. Полимеразная цепная реакция в лабораторной диагностике [Электронный ресурс]/ А.Ш.Орадова// Вестник КазНМУ.- 2013.-Режимдоступа:<https://kaznmu.kz/press/2013/09/27/полимеразная-цепная-реакция-в-лабора/>
50. Гусейнов, О. А. Методы биохимических исследований : учеб.метод.пособие к лаб. занятиям / О. А. Гусейнов. - Красноярск: Сиб. федерал.университет, 2012. - 46 с.
51. Амплификаторы ПЦР [Электронный источник]- Режим доступа: <http://www.tiaramed.ru/amplifikatory/view-all-products.html>.
52. Полимеразная цепная реакция [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o_pass/ММoB/10.pdf/
53. Усовершенствование технологии ПЦР [Электронный ресурс]- Режим доступа: <https://studfiles.net/preview/5778799/page:2/>
54. Охапкина, С.С. Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) и ее применение/ С.С. Охапкина, А.Г.Акишев, С.Х. Дегтярев [Электронный ресурс]- Режим доступа: <http://sciencerrussian.sibenzyme.com/papers/popularabout/using-pcr>.
55. Поляничко, А. М. Электрофорез в агарозном геле: учебно-методическое пособие / А. М. Поляничко – Москва : Наука, 2007. – 157с.
56. Электрофорез [электронный ресурс]- Режим доступа: http://bio.sfu-kras.ru/files/1901_SD.F.11__MY_LR_Metodi_biohimicheskikh_issledovaniy_BH_2009.doc
57. Pingoud, A. Type II restriction endonucleases : structure and mechanism / A. Pingoud [et al] // Cellular and molecular life sciences. – 2005. – Т. 62, №6. – P. 685-707.
58. Oiler, A. Ability of DNA and spermidine to effect the activity of restriction endonucleases from several bacterial species / A. Oiler [et al] // Biochemistry. - 1991, V.30.- P.543-549.

59. Рестриктазы типа II: узнавание сайтов рестрикции [Электронный ресурс]- Режим доступа: <http://medbiol.ru/medbiol/genexp/000ef3e3.htm>.
60. Янулайтис, А. А. Ферменты рестрикции и их применение / А. А. Янулайтис. - Люберцы: ВИНТИ, 1989. - 202 с.
61. Абдурашитов, М. А. Метод рестрикционного анализа геномов млекопитающих *in silico* / М.А. Абдурашитов [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчиннико : Москва, 2006. – Т.2. – № 3. – С. 29 – 39.
62. Томилова, Ю.Э. Эндонуклеазы рестрикции и их применение/ Ю.Э Томилова, С.Х. Дегтярев. [Электронный ресурс]- Режим доступа: <http://sciencerrussian.sibenzyme.com/papers/popularabout/restriction-endonucleases-using>.
63. SibEnzyme [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://russia.sibenzyme.com/products/restrictases>
64. Звездчатая активность [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/star-activity>.
65. Rasmussen, H. B. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis – valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting / H. B. Rasmussen. - InTech, 2012. – С. 315-334.
66. ПДРФ [Электронный ресурс]-Режим доступа: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/RFLP.htm>.
67. Hartung, T. In Silico Methods in Toxicology [Электронный ресурс] / T. Hartung, S. Hoffmann, J. Hopkins. – Baltimore: UB, 2009. – Режим доступа: http://www.altex.ch/resources/FFT_3_09.PDF.
68. Пономарева, Н. С. Применение расстояний редактирования при биоинформационном анализе геномов для задач оценки состояния репродуктивной системы/ Н. С. Пономарева., Г. Н. Реброва, Е. А. Колина // Фундаментальные исследования. – 2015. – №. 7. – С. 774 – 777.

69.Выделение и очистка ДНК для ПЦР [Электронный ресурс]- Режим доступа: <http://www.biokom.ru>.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ



Заведующий кафедрой

Е. И. Шишацкая

« 6 » июня 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Подбор рестриктаз для определения видов бактерий методом анализа
ПДРФ

Научный руководитель



доцент, к.б.н.

О. А. Гусейнов

Выпускник



Т. В. Деринг

Красноярск 2019