

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

Метод анализа ПДРФ в применении к идентификации бактерий

Научный руководитель \_\_\_\_\_

доцент, к.б.н., О.А. Гусейнов

Выпускник \_\_\_\_\_

О.А.Добровольская

Красноярск 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Дезоксирибонуклеиновая кислота.....	5
1.2 Выделение ДНК.....	6
1.3 Домен Archaea и домен Bacteria.....	7
1.4 Ген 16S рРНК.....	9
1.5 Полимеразная цепная реакция.....	10
1.6 Детекция результатов ПЦР.....	13
1.7 Очистка ДНК после реакции амплификации.....	13
1.8 Электрофорез.....	14
1.9 Рестрикция.....	16
1.10 Метод анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов.....	17
1.11 Секвенирование.....	18
1.12 Метод Сэнгера.....	19
1.13 Секвенирование нового поколения.....	20
1.14 Негенетические методы идентификации микроорганизмов.....	20
1.15 Хроматографические методы.....	22
1.16 Биохимическая идентификация микроорганизмов.....	23
1.17 Анализ микроорганизмов <i>in silico</i> .....	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	26
2.1 Объекты идентификации.....	26
2.2 Методика проведения амплификации и рестрикции <i>insilico</i> .....	26
2.3 Методика выделения ДНК.....	27
2.4 Особенности выделения ДНК.....	27
2.5 Проведение электрофореза.....	27
2.6 Проведение ПЦР.....	29
2.7 Проведение реакции рестрикции.....	30
2.8 Методика анализа <i>insilico</i> .....	30
3 РЕЗУЛЬТАТЫ.....	32
3.1 Выделение ДНК.....	32
3.2 Получение ампликонов гена 16S-рРНК.....	32
3.3 Проведение реакции рестрикции ампликонов 8F – 1492R.....	33

3.4 Проведение реакций рестрикции <i>in silico</i> .....	33
3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных.....	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	41
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	42
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	43

## **ВВЕДЕНИЕ**

Бактерии – древнейшая группа организмов. Множество полезных бактерий постоянно сопровождают человека на протяжении всей жизни и защищают наш организм от нежелательных внешних воздействий. Человек научился использовать полезные свойства бактерий во многих сферах деятельности. От производства продуктов, до лабораторных исследований и фармакологии. Бактерий применяют в очистке от нефтяных загрязнений, при удобрении почвы. Все эти задачи будут успешно выполняться при правильном определении видовой принадлежности того или иного микроорганизма.

Идентификация бактерий возможна разными методами: микробиологическими, биохимическими, молекулярно-генетическими. В данной работе был использован метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

### **Актуальность работы**

Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) является одним из наименее затратных, а главное, быстрых методов идентификации бактерий. Используя его, результат можно получить в течение суток. Еще одним преимуществом данного метода является то, что он не так чувствителен к посторонним примесям по сравнению как методы секвенирования.

### **Цель**

Использовать метод анализа ПДРФ гена 16S рРНК для идентификации предоставленных образцов бактерий.

### **Задачи**

1. Провести анализ ПДРФ ампликонов гена 16SpРНК, полученных с использованием праймеров 8Fi и 1492R, массива наиболее распространенных почвенных бактерий с использованием данных GenBank *in silico* и построить электрофореграммы.

2. Выделить ДНК из образцов биомассы бактерий. Проанализировать качество образцов ДНК спектрофотометрическим методом и методом электрофореза в агарозном геле.

3. Провести амплификацию полученной ДНК с использованием пар праймеров 8F и 1492R, исследовать качество полученных ампликонов.

4. Для полученных ампликонов провести реакции рестрикционного гидролиза, провести электрофорез продуктов гидролиза и задокументировать полученные электрофореграммы с использованием геледокументирующей системы.

5. Сравнить теоретические и экспериментальные электрофореграммы, идентифицировать исследуемые образцы.

6.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Дезоксирибонуклеиновая кислота

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) - макромолекула, состоящая из повторяющихся нуклеотидов четырёх видов и обеспечивающая хранение, а также передачу генетической информации в организмах из поколения в поколение [1].

ДНК у высших организмов находится в ядре клетки. ДНК бактерий имеет обычно кольцевую структуру и прикреплена изнутри к клеточной мембране [2].

Макромолекула ДНК состоит из двух цепей, ориентированных азотистыми основаниями друг к другу и закручена в виде спирали. В ней содержится всего четыре основания: гуанин, тимин, аденин, цитозин. Эти основания соединяются в двуспиральной цепи друг с другом водородными связями по принципу комплементарности: гуанин с цитозином, аденин с тимином. Эта особенность ДНК позволяет однозначно восстановить последовательность нити, имея на руках ее комплементарную копию. Последовательность нуклеотидов в ДНК позволяет «кодировать» информацию о различных типах РНК, наиболее важными из которых являются информационные (или матричные), рибосомальные и транспортные [3].

Двойная спираль ДНК обычно не взаимодействует с другими сегментами ДНК, и в человеческих клетках разные хромосомы пространственно разделены в ядре. Это расстояние между разными хромосомами важно для способности ДНК действовать в качестве стабильного носителя информации. Рекомбинация позволяет хромосомам обмениваться генетической информацией, в результате этого образуются новые комбинации генов [4].

ДНК играет важную биологическую роль. Она не только передает генетическую информацию, но и участвует во многих процессах, протекающих в клетке [5].

## 1.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК и РНК — необходимый шаг подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами. Многие биохимические процессы, такие как амплификация, проведение обратной транскрипции, сиквенс, гибридизация, синтез ДНК, не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительного выделения и очистки нуклеиновых кислот. Существует несколько общепризнанных методов получения ДНК из биологического материала, и в зависимости от поставленной задачи нужно выбрать наиболее оптимальную методику [6]. При выборе нужно помнить про несколько требований, предъявляемых к конечному результату, например - высокий выход нужного материала; время, требуемое для получения конечного продукта; высокое качество полученного материала.

В литературе описано множество методов, позволяющих выделять нуклеиновые кислоты из разнообразных биологических материалов, однако не все пригодны для автоматизации этого процесса [7]. Методы выделения ДНК можно разделить на жидко - и твердофазные методы.

Жидкофазные методы применяются когда требуется лизис биологического материала (например кровь или ткань) детергентами или хаотропными веществами. После стадии лизиса следует несколько стадий в которых применяют органические растворители (фенол, хлороформ или этанол). При помощи перхлората натрия можно достигнуть полного разделения белков и нуклеиновых кислот. Стандартная методика получения чистого препарата основана на том, что ДНК является полярной молекулой и не растворяется в органических растворителях [8]. Традиционно для выделения ДНК используется фенол-хлороформная экстракция. При перемешивании клеточного лизата и фенола формируются две фазы. Нуклеиновые кислоты расположены в верхней фазе, а денатурированные протеины — в нижней фазе [9]. В этом способе присутствует несколько

стадий центрифугирования и жидкостной экстракции, поэтому данный способ нельзя автоматизировать.

В твердофазных методах выделения нуклеиновых кислот используются следующие процессы и принципы: водородные связи с немодифицированной гидрофильной матрицей; ионообмен в водном растворе; аффинность; механизмы исключения по размеру. Твердофазные системы, поглощающие НК, состоят из кварцевых частиц, стеклянных волокон, анионообменные носителей, применяемые в хроматографических сепарационных колонках [10].

### **1.3 Домен Archaea и домен Bacteria**

К сравнительно новому домену Archaea относятся микроорганизмы, разделенные на три филума: Euryarchaeota, Crenarchaeota и Korarchaeota.

Первый филум объединяет повсеместно распространенные микроорганизмы. Это метаногены – строгие анаэробы, обитающие в донных осадках пресноводных зон, богатых органикой, или в рубце жвачных [11]. Широко распространены также экстремальные галофилы, растущие при высоких концентрациях соли и способные осуществлять особый тип фотосинтеза с помощью бактериородопсина, который на свету работает как протонная помпа.

Ко второму филуму относятся микроорганизмы, имеющие очень узкие и специфические места обитания. Это экстремофилы, зависящие от серных соединений, оптимумы pH и температуры роста которых отличаются экстремальными значениями [12]. Третий филум зарезервирован за представителями некультивируемых до настоящего времени прокариот, для которых, однако, известны последовательности генов, кодирующих молекулу 16S р РНК.

Кроме нуклеотидной последовательности 16S рРНК, археи отличаются от бактерий и эукарий рядом существенных признаков:



– Строением мембран и липидов мембран. В обычных липидах глицерол связан сложноэфирной связью с жирными кислотами, а у архей – простой эфирной связью с С20-спиртом – фитанолом. Такие эфиры могут образовывать тетрамеры (С40), а цепи фитанола могут содержать пятичленные кольца [13].

Мембрана, образованная из тетрамеров, более ригидна, так как у нее нет внутреннего пространства. Археи могут иметь как обычные бислойные, так и ригидные монослойные мембраны, но чем экстремальнее условия, тем больше монослойных областей находится в мембране.

– Археи содержат в мембранах 7 – 30 % изопреноидов (в частности, сквалена). Такие же соединения находят в нефтяных отложениях, что свидетельствует о древности этих микроорганизмов.

– Строением клеточных стенок. У архей не найдены, типичные для бактерий, пептидогликановые (мурейновые) клеточные стенки. Они представлены либо псевдомуреином (нет N-ацетилмурамовой кислоты), либо белковым S-слоем (структурированным белком, содержащим «кислые» аминокислоты, за счет чего на поверхности клетки создается тонкий слой воды, отталкивающий ионы солей). Еще один вариант организации архей – отсутствие клеточной стенки, когда мембрана почти полностью представлена ригидным монослоем из тетрамеров, усиленным большим количеством пятичленных колец, например, как у *Thermoplasma*.

– Особенности метаболизма. У архей ДНК связана с гистонами и имеет интронные участки, подобно эукариотам [14]. В тРНК архей не найдено риботимина. РНК-полимеразы этих организмов больше похожи на эукариотические по субъединичному составу. Трансляция белка не чувствительна к хлорамфениколу (как у бактерий), зато чувствительна к дифтерийному токсину (как у эукариот).

– Археи обычно существуют в экстремальных условиях и дают скудный рост. Однако в таких местообитаниях у них мало конкурентов, что позволило им сохраниться до настоящего времени [15].

#### 1.4 Ген 16S рРНК

Геномы прокариот даже в пределах одного вида являются динамичными структурами. Существуют понятия базового и вспомогательного генома, которые сложились исходя из внутривидовой вариабельности. Консервативные участки включают гены, ответственные за информационные системы репликации, транскрипции, трансляции, ключевые пути метаболизма и формирования клеточных структур, определяющих видовую и родовую принадлежность. Вспомогательными участками являются операционные гены, контролирующие разные процессы метаболизма и морфофизиологические признаки, обеспечивающие приспособленность к определенной экологической нише. Многие такие гены локализованы в плазмидах [16].

Ген 16S рибосомальной РНК является самым используемым маркерным геном бактерий для их идентификации. 16S-рРНК входит в состав малой 30S субъединицы рибосом прокариот. Ген 16S-рРНК несет как консервативные, так и вариабельные участки нуклеотидной последовательности [17]. Сиквенс этих последовательностей и используют как для определения рода, так и видовой идентификации микроорганизмов. Консервативные участки в основном идентичны у всех бактерий, а вариабельные участки можно использовать для идентификации бактерий.

Ген 16SpРНК можно использовать для оценки эволюционных отношений между бактериями, потому что он эволюционирует медленно, а его продукт жизненно необходим и поэтому функционально консервативен. Внутри одного вида сходство гена 16S-рРНК может достигать 98–99% [18].

Огромная база нуклеотидных последовательностей гена 16S-рРНК для большого количества бактерий позволяет сравнивать полученные последовательности с уже имеющимися, что позволяет идентифицировать микроорганизмы [19].

## 1.5 Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - это реакция амплифицирования ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы, она включает несколько циклов, где продукты, произведенные в предыдущем цикле, служат матрицей в последующем [20].

При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце [21].

Этот метод был изобретен американским биохимиком Кэрри Муллисом в 1983 году, за разработанный метод он получил Нобелевскую премию в 1993 году [22].

Помимо амплификации ДНК, ПЦР позволяет производить множество разных манипуляций с нуклеиновыми кислотами (сращивание фрагментов ДНК, введение мутаций), широко используется в медицинской и биологической практике, например, для диагностики заболеваний (инфекционных и наследственных); клонирования генов, установления отцовства и выявления новых генов [23]. Этот метод эффективен для изучения полиморфизма ДНК.

В основе метода ПЦР лежит природный процесс - комплементарное достраивание ДНК матрицы, которое осуществляется с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция называется репликация ДНК.

ПЦР - искусственный процесс многократной амплификации специфической последовательности ДНК, осуществляемый *in vitro* [24].

Для проведения ПЦР требуются следующие компоненты:

- *ДНК-матрица* - содержит участок, который требуется амплифицировать. Для ПЦР в качестве матрицы часто используется вся геномная ДНК [25].
- *Праймеры*-это короткие (10—20 нуклеотидов) одноцепочечные последовательности ДНК, комплементарные определенному участку ДНК.

На первом этапе подбираются два праймера таким образом, чтобы они с двух сторон ограничивали выбранный для анализа ген или его фрагмент. При этом один праймер (forward — прямой, обозначается буквой F) комплементарен участку на одной цепи ДНК, а другой (reverse — обратный, R) — участку на другой цепи [25].

Важнейшая характеристика праймеров — температура плавления ( $T_m$ ) комплекса праймер-матрица, при которой половина ДНК-матриц образует комплекс с праймером. Усредненная формула подсчета  $T_m$  :

$$T_m = 77,1 + 11,7 \lg \frac{G+C}{A+T}$$

где L — количество нуклеотидов в праймере,  $K^+$  — молярная концентрация ионов калия, G+C — сумма всех гуанинов и цитозинов [27].

- *Термостабильная ДНК-полимераза* – фермент катализирующий реакцию полимеризации ДНК согласно принципу комплементарности. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов: *Thermusaquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcusfuriosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcuswoesei* (Pwo-полимераза), *Thermusthermophilus* (Tth-полимераза) и другие.

- *Дезоксинуклеозидтрифосфаты* (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) - «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.)

- *Ионы  $Mg^{2+}$*  - необходимы для работы полимеразы. При нейтрализации отрицательного заряда нуклеотидов, они повышают их реакционную способность. Оптимальная концентрация магния колеблется в пределах 1-5мМ [25].

- *Буферный раствор* - включает в себя смесь анионов и катионов в определенной концентрации и стабильное значение pH. Обеспечивает необходимые условия реакции - pH, ионную силу раствора. Содержит соли,

бычий сывороточный альбумин. Обычно в его состав входят Tris-HCl (обеспечивает стабильность pH раствора), ПАВ (предотвращают «прилипание» ДНК к стенкам пробирки, стабилизируют фермент), минеральные соли (обеспечивают необходимую ионную силу раствора) [25].

- *Анализируемый образец* - подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, содержащий искомую ДНК. При отсутствии ДНК-мишени не образуется специфический продукт амплификации [25].

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

### 1. Денатурация

Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96° С в течение 0,5—2 мин., чтобы цепи ДНК разошлись. На этой стадии разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Перед первым циклом проводят длительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 мин для полной денатурации матрицы и праймеров [26].

### 2. Отжиг

После расхождения цепей, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре), либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре). Температура отжига подбираем в зависимости от состава праймеров и обычно на 4—5°С ниже их температуры плавления. Время стадии— 0,5—2 мин [26].

### 3. Элонгация

На этой стадии ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы в направлении от 3' к 5'.

Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 °С. 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.

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое нагревание и охлаждение пробирок, с точностью не менее 0,1° С. Ампликон — это единица амплификации [26].

### **1.6 Детекция результатов ПЦР**

На данный момент существует несколько основных способов детекции результатов ПЦР:

- Электрофоретический (в агарозном или полиакриламидном геле)
- ГИФА (гибридизационно — ферментный анализ)
- Гибридизационно — флуоресцентный (флуоресцентная метка)
  - регистрация продукта после окончания реакции амплификации «анализ по конечной точке»;
  - детекция продукта в режиме «реального времени» [27].

### **1.7 Очистка ДНК после реакции амплификации**

Одной из самых важных процедур в молекулярном клонировании является очистка нуклеиновых кислот. Ключевой этап — удаление белков — часто проводят с помощью экстракции водных растворов нуклеиновых кислот фенолом и (или) хлороформом.

Наиболее часто используемый метод концентрирования ДНК — осаждение ее этанолом. Осадок ДНК, образующийся при низкой температуре (-20°С или ниже) в присутствии умеренной концентрации моновалентных катионов, собирают центрифугированием и вновь растворяют в соответствующем буфере, доводя до нужной концентрации. Эта процедура является быстрой и количественной, даже если ДНК

присутствует в нанограммах. Для очистки и концентрирования ДНК в последнее время используют хроматографические колонки [28].

### **1.8 Электрофорез**

Электрофорез — это перемещение частиц дисперсной фазы в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля.

Впервые был открыт профессорами Московского университета П. И. Страховым и Ф. Ф. Рейссом в 1809 году [29].

Электрофорез является одним из наиболее важных методов для разделения и анализа компонентов веществ в химии. Этот метод находит широчайшее применение для разделения смесей биомолекул на фракции или индивидуальные вещества. Он используется в биохимии, молекулярной биологии, клинической диагностике, популяционной биологии [30].

В 70-х годах было продемонстрировано, что при помощи электрофореза можно определить длину и чистоту молекул ДНК, а также разделить и отделить нужные фрагменты. Этот метод легок, т. к. каждый нуклеотид в молекуле ДНК обладает отрицательным зарядом, который под действием приложенного электрического поля заставляет молекулы двигаться к аноду. Чтобы разделить молекулы ДНК, исходя из их размера, электрофорез проводят в гелях [31]. Были разработаны специальные гели, с помощью которых удастся разделить фрагменты ДНК длиной до 500 нуклеотидов, отличающиеся всего лишь на несколько нуклеотидов.

Поскольку поры в полиакриламидном геле для больших молекул ДНК слишком малы, то для разделения молекул ДНК по размеру были разработаны агарозные гели (агароза - полисахарид, получаемого из морских водорослей). Все эти методы разделения нуклеиновых кислот часто используются для аналитических и препаративных задач [32].

Агарозный гель-электрофорез – классический метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов нуклеиновых кислот. С помощью этого простого метода можно быстро разделить такие смеси

фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены любым другим методом [33].

Визуализацию результатов проводится в агарозном геле, который представляет собой застывшую после нагревания в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,0-2,5%, с добавлением специфического красителя, например бромистого этидия [34].

Остывшая агароза образует решетку в пространстве. При заливке с помощью гребенки в геле формируют лунки, в которые вносят анализируемые макромолекулы [35].

Пластину геля помещают в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения. Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от катода к аноду. При этом более короткие макромолекулы движутся быстрее, чем более большие [36].

Скорость перемещения ДНК через агарозу при гель-электрофорезе определяется следующими пятью главными критериями:

1. Размером макромолекулы;
2. Конформацией ДНК;
3. Концентрацией агарозы;
4. Напряженностью электрического поля;
5. Используемым электрофорезным буфером.

Краситель встраивается группами по всей плоскости молекулы ДНК.

После окончания электрофореза, продолжающегося от 20 мин до 3 часов, гель помещают на фильтр трансиллюминирующей установки, которая излучает свет в УФ-диапазоне (250 – 300 нм). Энергия УФ, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (600 нм) [37].

Бромистый этидий (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид) — интеркалирующий краситель, часто применяемый



в молекулярной биологии, например, для обнаружения молекул ДНК при электрофорезе в агарозном геле.

При освещении УФ-светом бромистый этидий светится оранжево-красным цветом. При связывании с нуклеиновой кислотой интенсивность флуоресценции увеличивается примерно в 15 раз.

### **1.9 Рестрикция**

Эндонуклеазы рестрикции (или рестриктазы) – группа ферментов класса гидролаз, катализирующие гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных ДНК в большинстве прокариотических и некоторых других организмах. Ферменты находят определенные последовательности нуклеотидов, называемые сайтами рестрикции, в ДНК чужеродной клетки и разрушают молекулу ДНК в этих участках [38]. Вместе с метилазами они образуют систему рестрикции и модификации в клетке.

Первые рестрикторные эндонуклеазы были выделены в 1968г. из штаммов *E. coli* В и *E. coli* К. Из различных штаммов микроорганизмов были выделены ферменты рестрикции, различающиеся между собой по структурной организации, потребностям к кофакторам и особенностям субстратной специфичности.

Рестриктазы всех типов отличаются исключительно высокой субстратной специфичностью – каждая узнает последовательность нуклеотидов строго определенной длины и состава. Основное различие между ними заключается в характере расщепления субстрата [39].

Самыми распространенными в молекулярных методах являются эндонуклеазы рестрикции II типа. Их сайты узнавания состоят из 4-8 нуклеотидных пар, а сами ферменты полностью гидролизуют ДНК [40].

На данный момент выделено более трех тысяч эндонуклеаз рестрикции. Более шестисот рестриктаз доступны в виде коммерческих препаратов и повседневно используются в лабораториях для модификации ДНК и решения генно-инженерных задач.

Ферменты рестрикции являются эффективным инструментом исследования. Они позволяют делить молекулы ДНК очень большого размера на фрагменты длиной от нескольких сотен до нескольких тысяч оснований. Но при слабой активности рестриктаз или при коротком промежутке времени рестрикции может происходить так называемая неполная (частичная) рестрикция, в результате чего образуются фрагменты большей длины, чем при полном расщеплении [41].

Фрагменты ДНК разной длины можно легко разделить с помощью метода электрофореза в агарозном геле.

Короткие фрагменты мигрируют намного быстрее, чем длинные. 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-маркеров[42].

Рестриктазы синтезируются разными бактериями, но чтобы не возиться с большим количеством разнообразных сред и подбором оптимума температуры и pH, часто клонируют гены рестриктаз в *E. Coli*.

Для каждого фермента рестрикции существуют оптимальные условия реакции, которые приводятся в описании, прилагаемом фирмой-изготовителем. Основные переменные параметры – это температура инкубации и состав буфера. К температурному режиму предъявляются достаточно жесткие требования, тогда как различия между буферами чаще всего бывают лишь незначительны[43].

### **1.10 Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов**

Наличие сайтов рестрикции в геномной ДНК и их взаимное расположение однозначно определяются последовательностью нуклеотидов исследуемой ДНК, поскольку сам сайт рестрикции - не что иное, как строго определенная последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая и расщепляемая рестриктазами.

Две молекулы ДНК будут разрезаны на фрагменты одинаковой длины, если молекулы идентичны. Но если в одной молекуле есть сайт рестрикции, а другой нет, то фрагменты будут различной длины. Если в одной молекуле будет больше или меньше пар оснований до сайта рестрикции, чем в другой, то фрагменты также будут различными и т.д. Это явление носит название полиморфизма длин рестриционных фрагментов ДНК (ПДФ, англ. restriction fragment length polymorphism, RFLP)[44].

На практике это означает, что, разрезая эндонуклеазами рестрикции часть генома представителей разных видов, можно получить фрагменты различной длины, в зависимости от строения проверяемой части генома индивидуума, а, следовательно, возможна их идентификация. Полное совпадение рестриционных картин по нескольким рестриктазам указывает на близкородственность данных штаммов.

Несмотря на то, что секвенирование ДНК может определить последовательность более точно, ПДФ был разработан как первый и дешевый метод для массового применения. Цена анализа зависит только от цены рестриктазы, не требует высокой квалификации персонала и дорогостоящего оборудования, всем необходимым оснащена любая ПЦР-лаборатория, занимающаяся, например, диагностикой инфекций, возможно генотипирование единичных образцов ДНК[45].

### **1.11 Секвенирование**

Секвенирование биополимеров — определение их аминокислотной или нуклетидной последовательности. В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде [46].

В результате секвенирования перекрывающихся участков ДНК<sub>д</sub> получают последовательности нуклеотидов, целых генов, тотальной мРНК и даже полных геномов организмов.

## 1.12 Метод Сэнгера

Метод секвенирования ДНК, также известен как метод обрыва цепи. Впервые этот метод был предложен Фредериком Сенгером в 1977 году, за что он был удостоен Нобелевской премии по химии в 1980 году [47].

В классическом варианте метода Сэнгера одна из цепочек анализируемой ДНК выступает в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепочки ферментом ДНК-полимеразой. Реакцию с одной и той же матрицей проводят в четырёх разных пробирках, каждая из которых содержит:

- праймер;
- небольшое количество радиоактивно меченного дезоксирибонуклеотида (P32 или S35), который включается в состав ДНК во время синтеза и позволяет впоследствии визуализировать продукты реакции;
- смесь трёх дезоксирибонуклеотидов в оптимальных для протекания реакции концентрациях, четвёртый дезоксирибонуклеотид в более низкой концентрации
- дидезоксирибонуклеотидов (ddNTP). У дидезоксирибонуклеотидов отсутствует 3'-гидроксильная группа, поэтому после их включения в цепь дальнейший синтез обрывается.

Таким образом, в каждой пробирке образуется набор фрагментов ДНК разной длины, которые заканчиваются одним и тем же нуклеотидом (в соответствии с добавленным дидезоксирибонуклеотидом) [48].

После завершения реакции содержимое пробирок разделяют электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и проводят радиоавтографию гелей.

Продукты четырёх реакций формируют «секвенирующую лестницу», которая позволяет «прочитать» нуклеотидную последовательность фрагмента ДНК.

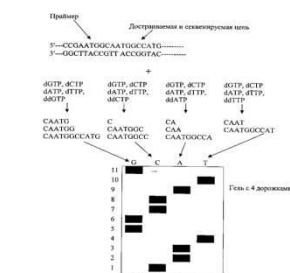


Рисунок 1 — Схема секвенирования ДНК по методу Сэнгера с терминацией дидезоксинуклеотидтрифосфатами (ddNTP) (по Шнеер, 2005).

Метод Сэнгера позволяет также определять нуклеотидную последовательность РНК, но она предварительно должна быть «переписана» в форме ДНК с помощью обратной транскрипции [49].

### 1.13 Секвенирование нового поколения

Техника методов секвенирования нового поколения (СНП) позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. Необходимость в массовом, качественном и быстром секвенировании стимулировала многочисленные модификации метода Сэнгера [50]. В той или иной степени изменениям подверглись практически все составляющие этого процесса. Переломной точкой развития технологии стало появление ПЦР и автоматизация основных этапов «чтения» ДНК, давшие начало методам секвенирования следующего поколения [51].

Платформы для методов нового поколения основываются на распараллеливании процесса «чтения» ДНК, и таким образом за один прогон работы секвенатора можно определить первичные структуры нескольких участков генома.

На сегодняшний день производительность некоторых секвенаторов измеряется уже сотнями миллиардов пар оснований, что, например, позволяет подобным приборам сканировать индивидуальный геном человека всего за несколько дней.

### 1.14 Негенетические методы идентификации микроорганизмов

Негенетические методы идентификации различных микроорганизмов разрабатывались и совершенствовались микробиологами и бактериологами

на протяжении многих лет, и сегодня эти методы активно используются в науке, медицине, фармацевтике, промышленном производстве (в том числе продуктов питания).

Процесс идентификации микроорганизмов является одним из самых важных и трудоемких этапов проведения биологических исследований [52].

Разработанные ранее методы представляют собой основу для исследователей и являются базисом большого количества методик, которые позволяют определять следующие свойства бактерий;

- морфологические (особенности и индивидуальные свойства строения клеток); Морфологическая характеристика и организация клеток бактерий включает такие признаки, как форма и размеры клеток, их подвижность, наличие жгутиков и тип жгутикования, способность к спорообразованию. Полезным может оказаться также выявление в клетках характерных мембранных систем и органелл (хлоросом, карбоксисом, фикобилисом, газовых вакуолей и т.д.), присущих отдельным группам бактерий, а также включений (параспоральных телец, гранул волютина, полигид-роксibuтирата, полисахаридов и т.д.). Первостепенное значение для систематики бактерий придается окраске клеток по Граму и строению их клеточных стенок;
- культуральные (питание, дыхание, условия роста бактериальной культуры). Физиолого-биохимические свойства включают прежде всего установление способа питания исследуемой бактерии (фото / хемо-, авто / гетеротрофия) и типа энергетического метаболизма (способность к брожению, аэробному или анаэробному дыханию или фотосинтезу). Важно определить такие признаки, как отношение бактерии к молекулярному кислороду, температуре, рН среды, солености, освещенности и другим факторам среды. В данную группу признаков входит также перечень субстратов, утилизируемых в качестве источников углерода, азота и серы, потребность в витаминах и других факторах роста, образование характерных продуктов

метаболизма, наличие некоторых ферментов. Для этого используют специальные тесты;

- ферментативные (биохимические свойства, связанные со способностью бактериальной культуры расщеплять сахара, белки, разрушать эритроциты);
- антигенные (свойства, связанные с особенностями антигенов чистой бактериальной культуры).

Разработанные методы идентификации микроорганизмов делят на рутинные и современные. Предпочтение отдается методам идентификации, которые выполняются за относительно короткий срок (часы) и отличаются высокой степенью объективности и точности [53].

### **1.15 Хроматографические методы**

С целью индикации и идентификации микроорганизмов нередко используют хроматографические методы. В объектах исследования определяют химический состав клеточной стенки и некоторые метаболиты микроорганизмов, причем как промежуточные, так и уникальные. Чаще всего у бактерий определяют короткоцепочечные жирные и тейхоевые кислоты, миколовую кислоту, используя метод газожидкостной хроматографии.

Нередко пользуются тонкослойной хроматографией. Содержание исследуемых веществ у различных родов бактерий постоянное, и это явление позволяет идентифицировать виды [54].

Различия в составе липидов используют для идентификации бактерий на уровне рода и даже вида. Однако этот метод имеет определенные ограничения, поскольку содержание жирных кислот в клетках может зависеть от условий культивирования и возраста культуры.

В систематике некоторых бактерий учитывается состав хинонов и других переносчиков электронов, а также пигментов.

Важная информация о взаимном родстве бактерий может быть получена при изучении клеточных белков – продуктов трансляции генов. На

основании изучения мембранных, рибосомных, суммарных клеточных белков, а также отдельных ферментов сформировалось новое направление – белковая таксономия [55]. Спектры рибосомных белков относятся к числу наиболее стабильных и используются для идентификации бактерий на уровне семейства или порядка. Спектры мембранных белков могут отражать родовые, видовые и даже внутривидовые различия. Однако характеристики химических соединений клетки не могут использоваться для идентификации бактерий изолированно от других данных, описывающих фенотип, поскольку нет критерия оценки значимости фенотипических признаков.

### **1.16 Биохимическая идентификация микроорганизмов**

Биохимическая идентификация основывается на определении ферментов микроорганизмов. Присутствие ферментов определяют по их способности разлагать соответствующие субстраты, для такой идентификации необходимо 18 – 24 часа [56]. В последнее время определяют непосредственно сами ферменты, для такой идентификации требуется 4 – 6 часов.

Согласно международной биохимической классификации ферментов, в зависимости от катализируемой реакции выделяют 6 основных классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы. Отдельные представители каждого класса ферментов имеют систематическое название, традиционное (тривиальное) название, а также четырехуровневый числовой код, который отражает класс, подкласс, под-подкласс и серийный номер фермента в под-подклассе.

Кроме систематического названия ферменты микроорганизмов имеют традиционные названия, получаемые в зависимости от субстратной специфичности. Традиционно ферменты микроорганизмов классифицируются на сахаролитические, протеолитические, липолитические, окислительно-восстановительные ферменты, а также ферменты-токсины, которые определяют с помощью специальных сред или тестов [57].



Биохимическая идентификация чистой культуры бактерий проводится с помощью дифференциально-диагностических сред. Дифференциально-диагностические среды содержат субстрат для какого-либо фермента, выявляемого у микроба, и индикатор, фиксирующий изменение pH питательной среды и окрашивающий ее в цвета, характерные для кислых или щелочных значений pH.

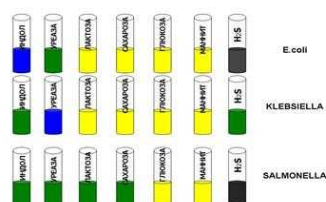


Рисунок 2 — Пример биохимической (ферментативной) активности представителей семейства энтеробактерий. В среды добавлен индикатор - бромфеноловый синий, при нейтральных значениях pH среда имеет травянисто-зеленый цвет, при кислых значениях - жёлтый, при щелочных значениях pH - синий. Положительная проба на сероводород сопровождается почернением среды вследствие действия специального реактива.

### 1.17 Анализ микроорганизмов *in silico*

*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 [58].

Осуществляют такие манипуляции как: теоретические 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 [59].

В настоящее время 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.

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

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объекты идентификации

Образцы биомассы почвенных бактерий были предоставлены Ольгой Кондратенко, магистрантом кафедры.

### 2.2 Методика проведения амплификации и рестрикции *insilico*

*Insilico*— это латинское фраза, которая употребляется в значении «сделано с помощью компьютера или с помощью компьютерной симуляции». Фразу стали употреблять по аналогии *in vivo* или *in vitro*, которые широко используются в биологии. Латыни *insilico* ничего не значит; это искусственно созданная фраза.

Фраза «*insilico*» употребляют только в случаях, когда с помощью компьютера создают модели процессов, происходящих в природе или в лабораторных условиях. Это относится ко всем естественным наукам. Но в других случаях фразы «компьютерные расчеты» и «*insilico*» не тождественны [60].

Виртуальная полимеразная цепная реакция (ПЦР *insilico*, цифровая ПЦР, электронная ПЦР, e-ПЦР) — математический метод компьютерного анализа теоретической полимеразной цепной реакции, использующий данные о нуклеотидных последовательностях праймеров (или ДНК-зондов) для предсказания амплификации фрагментов генома, хромосомы, или другого участка ДНК

Из GenBank берут последовательности гена. Виртуально получают ампликоны, используя соответствующие праймеры. Данные заносят в программу для ДНК анализа pDRAW32 [61]. В ней для проведения рестрикции выбирают нужные рестриктазы из базы данных программы. Данные о фрагментах рестрикции может быть представлена в графическом и текстовом виде. Далее для проведения виртуального гель-электрофореза выбирают маркер и концентрацию геля. Программа представляет виртуальные электрофореграммы для каждой рестриктазы.

### **2.3 Методика выделения ДНК**

Бактериальную геномную ДНК выделяют при помощи набора *SILICA* согласно приложенной инструкции. Метод выделения основан на эффективном выходе геномной ДНК за счет лизирующего раствора. ДНК находится в верхней фазе. Затем верхнюю фазу с ДНК переносят в новую пробирку и добавляют к ней суспензию сорбента, с которым она связывается, перемешивают и оставляют на некоторое время, далее центрифугируют. Убирают супернатант. Встряхивают на вортексе и центрифугируют один раз после добавления отмывочного раствора №1 и два раза после раствора №2, каждый раз снимая надосадочную жидкость перед добавлением следующего раствора. Очищенная бактериальная ДНК в осадке сушат в термостате и элюируют элюирующим раствором, затем вновь термостатируют. Содержимое пробирок встряхивают на вортексе, центрифугируют. Супернатант с ДНК переносят в чистые пробирки [62].

### **2.4 Особенности выделения ДНК**

ДНК может быть выделена, как и из грамотрицательных, и грамположительных бактериальных штаммов. При выделении ДНК из грамположительных бактерий необходимо инкубировать при 37 °С в течение 30 минут против 5 минут для грамотрицательных бактерий после добавления лизоцима. Выделение ДНК из грамположительных бактерий требует большего времени обработки лизоцимом [63].

Грамположительные бактерии — это те бактерии, которые сохраняют окраску после промывания при использовании метода окрашивания бактерий по Граму.

### **2.5 Проведение электрофореза**

Необходимое оборудование для проведения электрофореза

1. Источник питания Bio-Rad PowerPac HV (1-400 Вт, 0,01-500 мА, 20-5000 В)

2. Камера для горизонтального электрофореза (гель 7x10) Mini-SubCellGT, Bio-Rad.

3. Гель-документирующая система Bio-RadGelDocXRс компьютером.

#### **Ход работы:**

1. Добавила необходимое количество порошка агарозы (0,75 г) в рассчитанный объем электрофорезного буфера (50 мл).

2. Нагрела взвесь в микроволновой печи до тех пор, пока агароза не образует равномерную суспензию. Суспензию довела до начала кипения, затем осторожно удалила из микроволновой печи и охладила до 70° С.

3. Залила полученную суспензию в форму для агарозы.

4. Установила гребенку в форму для агарозы. Необходимо, чтобы между дном лунки от гребенки и основанием геля оставался слой агарозы толщиной 0,5-1,0 мм.

5. После того как гель полностью затвердел (через 20-30 мин.), удалила гребенку и поместила гель в электрофорезную кювету.

6. Добавила достаточное количество электрофорезного буфера.

7. Смешала пробы ДНК с буфером для нанесения, содержащим глицерин и красители (бромфеноловый) в соотношении 5:1.

8. С помощью автоматической микропипетки внесла смесь в лунки геля под электрофорезный буфер.

9. Подсоединила электроды к источнику напряжения. Напряженность при проведении разделения в агарозных гелях составляет 50 V. Красители, как и ДНК, перемещаются к аноду. Бромфеноловый синий передвигается со скоростью равной скорости фрагмента ДНК из 900 пар оснований.

10. По окончании разделения вынула подложку с гелем из кюветы и поместила гель в красящий раствор (1 мкг/мл этидиум бромид). После 20 мин. прокрашивания вынула гель и промыла в воде в течение 2 мин.

11. Удалила лишнюю жидкость и переложила гель в камеру трансиллюминатора гель-документирующей системы.

12. Рассмотрела гель в проходящем ультрафиолетовом свете. Зафиксировала полученное изображение и оформила результаты, используя гель-документирующую систему [64].

## 2.6 Проведение ПЦР

Для проведения реакции ПЦР требуются дистиллированная вода, 10-кратный буфер, dNTP, праймеры(8F и 1492R – для ампликонов размеров 1500 п.о.), MgCl<sub>2</sub>, образцы выделенной ДНК, Hotstart ДНК-полимераза (сибэнзим). Все компоненты, кроме образцов смешивают в одной пробирке. Затем в разные пробирки добавляют данную смесь, а также разные образцы ДНК. Далее пробы помещают в амплификатор Bio-rad–MJMiniPersonalThermalCycler. ПЦР проходит в соответствии с программой:

1. 95°C – 4:00;
2. 95°C – 0:16;
3. 58°C – 0:22;
4. 72°C – 1:55;
5. GO TO 2 36 times;
6. 72°C – 6:30;
7. 4°C – 18:00:00;
8. END

Далее полученные ампликоны подвергают электрофорезу.

HotStartTaq ДНК-полимераза [65] - сложной смесь термостабильной Taq ДНК-полимеразы молекулярной массой 94 kD (из рекомбинантного штамма E.coliэкспрессирующего ген ДНК-полимеразы из Thermusaquaticus YT1) и специфических моноклональных антител. HotStartTaq полимераза неактивна в условиях приготовления реакции амплификации. Это позволяет исключить ошибочное праймирование на стадии подготовки. HotStartTaq не нужно

нагревать для активации фермента. Неактивный комплекс HotStartTaqдиссоциирует автоматически при повышении температуры выше + 70 °C, приводя к активации ДНК-полимеразы.

## 2.7 Проведение реакции рестрикции

Перед проведением рестрикционного анализа ампликоны были очищены с помощью набора Diatom DNA Clean-UP [66]. Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 2 ч. в приборе Thermomixercomfort производство фирмы Eppendorf. Реакция проходила при 37 °C (для рестриктазыRsaI, HaeIII); 65 °C (для рестриктазыTru9 I) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 ед. акт.рестриктазы.

Постановка реакции рестрикции, для 1 пробы объемом 50 мкл необходимо:

- 5 мкл 10x буфера
- 10 мклразб. BSA
- 25 мкл H<sub>2</sub>O
- 10 мкл ДНК
- 5 мкл фермента (активность фермента 10 000 е.а/мл)

Все вещества смешали на холоду в 1 пробирке объемом 2 мл, из расчета на 15 проб, затем в каждую пробирку добавили по 35 мкл данной смеси и по 15 мкл исследуемой ДНК.

Для визуализации результатов рестрикции использовали электрофорез.

## 2.8 Методика анализа *insilico*

*Insilico* – термин, обозначающий компьютерное моделирование эксперимента, чаще биологического.

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 методы как: теоретические

амплификацию, рестриктирование, электрофорез. Данный метод позволяет анализировать различные геномы, имеющие длину до нескольких миллиардов пар нуклеотидов, за короткое время, осуществлять поиск нужных последовательностей ДНК, РНК, белков и работать с ними [67].

Был проведен рестрикционный анализ *insilico* ампликонов их генов 16S-рРНК с помощью программы pDRAW32. После теоретического рестриктирования ампликонов последовательностей 8F-1492R взятых из базы данных GenBank для каждого вида были построены рестрикционные профили.



### **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

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

п.о. - пары оснований

ПАУ - полициклические ароматические углеводороды

УФ - ультрафиолетовое излучение

НК - нуклеиновые кислоты

*E. coli* - *Escherichia coli*

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Панчин, А. Ю. Сумма биотехнологии / А. Ю. Панчин. – Москва : АСТ, 2015. – 432 с.
2. Льюин, Б. Гены / Б. Льюин - Москва: Мир, 1987. - 1064 с.
3. Cross, T. Aquatic actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats / T. Cross // J. Appl. Bacteriol. - 1981. - № 50. - P. 597-424.
4. Прудникова, С. В. Микробиология с основами вирусологии : конспект лекций / С. В. Прудникова. – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – 152 с.
5. Cremer, T. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells / T. Cremer, C. Cremer // Nat Rev Genet. –2001. – № 2. – P. 292–301.
6. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. - Изд. 3<sup>-е</sup> - Москва : Медицина. - 2007. – 700 с.
7. Moss, D. An Easily Automated, Closed-Tube Forensic DNA Extraction Procedure Using a Thermostable Proteinase / D. Moss, S. A. Harbison, D. J. Saul // Int. J. Legal Med. - 2003. - V. 117. - P. 340–349.
8. Гусейнов, О. А. Методы биохимических исследований : учеб.метод. пособие к лаб. занятиям / О. А. Гусейнов. - Красноярск: СФУ, 2012. – 46 с.
9. Бациллы [Электронный ресурс]: база данных - Режим доступа: <http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/103921>
10. Николаев, А. Я. Биологическая химия: учебное пособие / А. Я. Николаев. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2007. – 589 с.
11. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Д. Пастернак – Москва: Мир, 2002. – 589 с.

12. Nicholson, W. L. Resistance of *Bacillus* Terrestrial and Extraterrestrial Environments / W. L. Nicholson [et al] // Microbiology and Molecular biology reviews. - 2000. - V. 64. - № 3. - P. 584-572.
13. Copeland, W. C. Mitochondrial DNA Methods and Protocols / W. C. Copeland // MMB. - 2002. V. 197. - P. 199-212.
14. Rapley, R. The Nucleic Acid Protocols Handbook / R. Rapley // University of Hertfordshire. - 2000. - P. 3-9.
15. Chachaty, E. Isolating Chromosomal DNA from Bacteria / E. Chachaty, P. Saulnier. // The Nucleic Acid Protocols Handbook. - 2000. - P. 29-32.
16. Teeters, M. A. Adsorptive Membrane Chromatography for Purification of Plasmid DNA / M. A. Teeters, S. E. Conrardy, B. L. Thomas // J. Chromatography. - 2003. - V. 989. - P. 165–173.
17. Краткий определитель бактерий Берджи: [под ред. Дж. Хоулт]: [пер. с англ.] / Под ред. чл.-кор. АН СССР Г. А. Заварзина. - Изд. 7-е, - Москва: Мир, 1980. – 495 с.
18. Сулова, М. Ю. Распространение и разнообразие спорообразующих бактерий рода *Bacillus* в водных экосистемах: дис... канд. биол. наук: 03.00.16, 03.00.07 / М. Ю. Сулова ; Рос.акад. наук, Сиб. отд-ние, Лимнол. ин-т. - Улан-Удэ, 2007. – 163 с.
19. Goodfellow, M. Delineation and description of microbial populations using numerical methods, in: Computer Assisted Bacterial Systematics / M. Goodfellow, C. H. Dickinson // Academic Press. - Orlando. - 1985. - P. 166-226.
20. Attwell, R. W. Thermoactinomyces as terrestrial indicators for estuarine and marine waters, in: Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes / R. W. Attwell, R. R. Colwell // Academic Press. - London. - 1984. - P. 453-372.
21. Allen, D. A. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery / D. A. Allen [et al] // J Gen. Microbiol. - 1983. - № 129. - P. 2043-2062.

22. Головачева, Р. С. Новый вид термофильных бацилл – *Bacillus thermocatenuatus* nov. sp. / Р. С. Головачева, Л. Г. Логинова, Т. А. Салихов, А. А. Колесников, Г. Н. Зайцева // Микробиология. - 1975. Т. XLIV, № 2. - С. 265- 268.
23. Logan, N. A. Distinction between emetic and other strains of *Bacillus cereus* using the API system and numerical methods / N. A. Logan [et al] // FEMS Microbiol. Lett. - 1979. - № 5. - P. 373-375.
24. Wolf, J. Taxonomic and related aspects of thermophiles within the genus *Bacillus*, in: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria: Classification and Identification / J. Wolf [et al]// Academic Press. - London. - 1981. - P. 251-296.
25. Gilbert, R. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species: Their part in food poisoning and other clinical infections, in: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria: Classification and Identification / R. Gilbert [et al] // Academic Press. - London. - 1981. - P. 207-314.
26. Кравец, А. П. Изменения профиля метилирования ДНК растений пшеницы при хроническом  $\gamma$  облучении семян / А. П. Кравец [и др.] // Цитология и генетика. - 2010. - №. 5. – С. 18 – 22.
27. Williams, A. G. Hemicellulose degrading enzymes synthesized by rumen bacteria / A. G. Williams, S. E. Withers // J. Appl. Bacteriol. - 1981. - № 51. - P. 375-385.
28. Williams, A. G. *Bacillus* sp. in the rumen ecosystem. Hemicellulose depolymerases and glycoside hydrolases of *Bacillus* sp. and rumen isolates grown under anaerobic conditions / A. G. Williams, S. E. Withers // J. Appl. Bacteriol. - 1983. - № 55. - P. 283-292.
29. Jones, K. Nitrogen fixation by the rumen contents of sheep / K. Jones, J. G. Thomas // J. Gen. Microbiol. - 1974. - № 85. - P. 97-101.
30. Woese, C. R. Bacterial evolution / C. R. Woese // Microbiol. Rev. – 1987. – V.51. – P. 221–271.

31. Жимулев, И. Ф. Общая молекулярная генетика / И. Ф. Жимулев. - Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2003. - 480 с.
32. Woese, C. R. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA / , C. R. Woese, G. E. Fox, L. Zablen // Nature. – 1975. V. 254. – P.83–86.
33. Патрушев, Л. И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. - Москва : Наука, 2004. - 530 с.
34. Колтовая, Н. А. Практикум по молекулярной биологии / Н. А. Колтовая. - Москва : Наука, 2010. - 31 с.
35. National Center for Biotechnology Information – [Электронный ресурс] : режим доступа <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
36. ПЦР [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://bigenc.ru/biology/text/3153433>
37. Ребриков, Д. В. ПЦР в реальном времени: учебник / Д. В. Ребриков, Д. В. Саматов, Д. Ю. Трофимов. - Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
38. Паренков, А. Д. Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Часть 2. Методы молекулярной диагностики: учебно-методическое пособие / А.Д. Перенков [и др.] – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. И.Н. Лобачевского, 2015. – 44 с.
39. Полимеразная цепная реакция [Электронный ресурс] – Режим доступа: [http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o\\_pass/MMoB/10.pdf](http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o_pass/MMoB/10.pdf)
40. Воробьев, А. А. Полимеразная цепная реакция и ее применение для диагностики в дерматовенерологии: учебник / А. А. Воробьев - Медицинское информационное агентство, 2004. – 72 с.
41. Детекция результатов ПЦР [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.dna-technology.ru/files/images/metodichki/OsnoviPCR.pdf>
42. Pingoud, A. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism / A. Pingoud [et al] // Cellular and molecular life sciences. – 2005. - V. 62. - №. 6. - P. 685-707.

43. Чмуж, Е. В. Новая эндонуклеаза рестрикции *BisI* из *Bacillus subtilis* ТЗО узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G (m5C)> I'NGC-3' / Е. В. Чмуж [и др.] // Биотехнология. – 2005. - № 3. – С. 22 – 26.
44. Рестриктазы [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://studfiles.net/preview/4597142/>
45. Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз [электронный ресурс] – режим доступа: [http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3\\_2.htm](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_2.htm)
46. Пунина, Н. В. Изучение генетического разнообразия *Bacillus thuringiensis*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, при помощи анализа генов 16S рРНК / Н. В. Пунина, В. С. Зотов, А. Л. Пархоменко // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2013. Т. 5, № 1. – С. 93–103.
47. Кузьмина, Н. Раздел : Генная инженерия: построение карт рестрикции [Электронный ресурс] / Биотехнология – Режим доступа [http://www.biotechnolog.ru/ge/ge4\\_1.htm](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge4_1.htm)
48. GenBank [Электронный ресурс] : база данных – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
49. Классификация рестриктаз [Электронный ресурс] - Режим доступа: [https://studopedia.su/8\\_1987\\_restriktazi.html](https://studopedia.su/8_1987_restriktazi.html)
50. Slaymaker, I. M. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity / I. M. Slaymaker [et al] // Science. – 2016. –V. 351. – P. 84-88.
51. Чернухин, В. А. Сравнительный рестрикционный анализ хромосомной ДНК крысы *in vitro* и *in silico* / В. А. Чернухин [и др.] // Вестник биотехнологии, 2006. – Т. 2. - №. 3. – С. 39.
52. Белова, Е. Г. Герпесвирусы 6, 7, 8-го типов / Е. Г. Белова, Т. К. Кускова // Лечащий врач. – 2006. – Т. 2. - С. 76 – 79.
53. Зернов, Ю. П. Использование рестрикционного анализа амплифицированного гена 16S РНК для идентификации микроорганизмов на примере бактериальных продуцентов

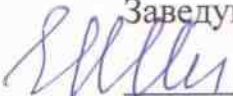
- термолабильной щелочной фосфатазы / Ю. П. Зернов, М. Л. Абдурашитов, С. Х. Дегтярев // Биотехнология. – 2005. - №. 6. – С. 3 – 11.
54. Сова, В.В. Введение и очистка белков. Методическое пособие по курсу/ В. В. Сова, М. И. Кусайкин // Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. – 42 с.
55. Альбертс, Б. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рэфф – Москва: Мир, 1994. – Т. 1. – 517 с.
56. Pingoud, A. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism / A. Pingoud [et al]// Cellular and molecular life sciences. – 2005. – V. 62. – №. 6. – P. 685-707.
57. Поляничко, А. М. Электрофорез в агарозном геле: учебно-методическое пособие / А. М. Поляничко – Москва : Наука, 2007. – 157 с.
58. Гусейнов, О.А. Методы биохимических исследований: учеб.-метод. пособие к лаб. занятиям / О. А. Гусейнов. - Красноярск: СФУ, 2011. – 48 с.
59. Короткевич, О.С. Молекулярная биология: методические разработки по выполнению лабораторных работ / О.С. Короткевич, О. И. Себежко, М. П. Люханов. – Новосибирск: НГАУ, 2017. – С.19.
60. Бромистый этидий [Электронный ресурс] - Режим доступа: [https://memtrick.com/set/krasiteli\\_9941](https://memtrick.com/set/krasiteli_9941)
61. RFLP Method - Restriction Fragment Length Polymorphism [электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/RFLP.html>
62. Негенетические методы идентификации микроорганизмов [Электронный ресурс] - Режим доступа: [https://studref.com/403094/tovarovedenie/identifikatsiya\\_mikroorganizmov](https://studref.com/403094/tovarovedenie/identifikatsiya_mikroorganizmov)



63. Guseynov, O. Effects of ionizing radiation on marine bacteria / O. Guseynov [etal] // Luminescence, - 2014 - V.29. - N1. - p. 57-58.
64. Идентификация микроорганизмов [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://studfiles.net/preview/3882817/page:17/>
65. Vogelstein, B. Preparative and analytical purification of DNA from agarose / B. Vogelstein, D. Gillespie // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 1979. V. 76, I 2. - P. 615-619.
66. Гааль, Э.  
Электрофорез в разделении биологических макромолекул: учебник / Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецкеи // Москва: Мир, 1982 – 447 с.
67. Hartung, T. Food for Thought ... on 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](http://www.altex.ch/resources/FFT_3_09.PDF)

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ


Заведующий кафедрой  
 Е. И. Шишацкая

« 7 » июня 2019 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Метод анализа ПДРФ в применении к идентификации бактерий

Научный руководитель 

доцент, к.б.н., О.А. Гусейнов

Выпускник 

О.А.Добровольская

Красноярск 2019