

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

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Е. И. Шишацкая

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 г.

## **БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

«Применение ПЦР в изучении микрофлоры»

Научный руководитель \_\_\_\_\_ доцент, к.б.н. О. А. Гусейнов

Выпускник \_\_\_\_\_ Е.Л.Панченко

Красноярск 2020

## РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа по теме "Применение ПЦР в изучении микрофлоры" содержит 39 страниц текстового документа, 14 иллюстрации, 6 таблиц, 40 использованных источников.

Ключевые слова: микрофлора, ARDRA, ген 16S рРНК.

**Цель данной работы:** определить видовой состав предоставленных образцов почвенных бактерий используя ПЦР.

На основании поставленной цели были определены следующие **задачи:**

1. Извлечь ДНК из образцов бактерий, определить их содержание в полученных растворах и качество препаратов данных препаратов.
2. Получить фрагменты гена 16S рРНК с использованием ПЦР.
3. Провести реакции рестрикции для полученных фрагментов.
4. Провести горизонтальный гель-электрофорез гидролизатов этих фрагментов в агарозном геле.
5. Обработать гели с помощью гель-документирующей системы и сравнением с электрофореграммами из нашей базы данных идентифицировать виды данных образцов

Микрофлора имеет как положительное влияние на окружающую среду и жизнедеятельность людей, так и отрицательную сторону воздействия. В то же время многие бактерии могут являться первопричиной заболеваний людей, животных и других организмов.

Метод ARDRA, основанный на применении ПЦР с информативными рестриктазами, удобен для идентификации бактерий микрофлоры и не требует дорогостоящего оборудования идентификации микроорганизмов. Метод дешёвый и скорый.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Распространение микрофлоры в природе .....	6
1.2 Влияние микрофлоры на человека.....	7
1.3 Методы идентификации микроорганизмов .....	8
1.4 Ген 16S рРНК .....	10
1.5 Применение ПЦР .....	10
1.6 Очистка ДНК от ненужных сопутствующих компонентов после реакции амплификации .....	12
1.7 Рестрикция ДНК.....	12
1.8 Электрофорез ДНК .....	14
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	16
2.1 Объекты исследования .....	16
2.2 Методика выделения ДНК .....	16
2.3 Проведение полимеразной цепной реакции.....	16
2.4 Проведение реакции рестрикции .....	17
2.5 Проведение электрофореза .....	18
2.6 Методика анализа in silico.....	19
2.7 Методики очистки ампликонов .....	20
3 РЕЗУЛЬТАТЫ.....	22
3.1 Проведение анализа in silico .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.2 Выделение ДНК из биомассы бактерий .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.3 Получение ампликонов гена 16S рРНК.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.4 Проведение реакций рестрикции .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	31

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	32
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	37

### **Актуальность работы**

В современном мире широко используются свойства микроорганизмов. В то же время микроорганизмы, обладающие полезными для человека свойствами, могут быть и патогенными. Поэтому, перед тем как начать использовать новые организмы, очень важно их правильно идентифицировать. Знание вида микроорганизма, находящегося в данной среде обитания например, в кишечнике человека, позволяет легче справляться с проблемами, возникающими в этой среде например, после операции. Поэтому очень важно уметь скоро и надёжно определять виды микроорганизмов, населяющих данную экосистему. В последнее время все более широкое применение находят методы определения микроорганизмов, связанные с изучением их ДНК [1].

**Цель работы:** Определить видовой состав предоставленных образцов почвенных бактерий используя ПЦР.

### **Задачи**

1. Извлечь ДНК из образцов бактерий, определить их содержание в полученных растворах и качество препаратов данных препаратов.
3. Получить фрагменты гена 16S рРНК с использованием ПЦР.
3. Провести реакции рестрикции для полученных фрагментов.
4. Провести горизонтальный гель-электрофорез гидролизатов этих фрагментов в агарозном геле.
5. Обработать гели с помощью гель-документирующей системы и сравнением с электрофореграммами из нашей базы данных идентифицировать виды данных образцов

Работа выполнена на кафедре Медицинской биологии в Институте Фундаментальной Биологии и Биотехнологии.



## ВВЕДЕНИЕ

Микрофлора — это все микробы, которые обитают на планете Земля. Микрофлора почвы, воздуха, вод Мирового океана и даже земных недр обладает всевозможными конфигурациями. Микрофлора, присутствующая в ЖКТ разных видов живых организмов имеет гораздо большую специфичность. В ее состав, как правило, входят микробы-симбионты [2].

Очень часто микрофлору классифицируют на свою и чужеродную.

Так же разделяют микробов по способу их питания:

- Эвтотрофы способны перерабатывать органику;
- Олиготрофы могут минерализовать останки живых организмов;
- Литотрофы работают с содержимым горных пород и газами.

Ученые, которые занимаются исследованиями микрофлоры, опираются на множество факторов. В их число нередко входят такие параметры как соотношение физико-химических показателей, объем и численные показатели видового разнообразия, а так же преобладающие в микрофлоре виды, которые оказывают воздействие на среду своего обитания.

В горных породах окисление идет за счет специфических видов бактерий, в ЖКТ жвачных животных свою роль играет микрофлора, которая способна расщеплять клетчатку. Бактерии, которые обитают на представителях Царства Растений (эпифиты), расщепляют выделяемые хозяевами вещества.

Кожа, слизистые, выстилка ЖКТ и прочие органы животных и *Homo sapiens* обладают постоянным бактериальным составом [3].

Микрофлора имеет как положительное влияние на окружающую среду и жизнедеятельность людей, так и отрицательную сторону воздействия. Люди широко используют свойства микроорганизмов для своих нужд и представить себе жизнь людей без использования микроорганизмов просто нереально. В то же время многие микроорганизмы могут являться первопричиной заболеваний людей, животных и других организмов [4].

# **1 Обзор литературы**

## **1.1 Микрофлора в окружающем мире**

Бактерии обитают во всех сферах Земли. Они живут в воздушных массах, скальных породах, водах Мирового океана. Микроорганизмы оказывают влияние в огромном числе важнейших процессах, протекающих в биосфере.

Круговорот веществ был бы невозможен в отсутствие бактерий. Растения не смогли бы усваивать атмосферный азот без азотфиксирующих бактерий. Разложение трупов так же было бы невозможно без бактерий-сапрофитов [5].

Плодородные почвы являются естественным местообитанием для бактерий. Они принимают участие в круговороте биосферы. Оттуда они мигрируют в Мировой океан и воздушные массы.

Именно почва на планете Земля обладает лучшими условиями для жизни и жизнедеятельности бактерий. Они потребляют пищу, воду и необходимые для дыхания газы. Так же почва способна защищать микроорганизмы от ультрафиолетовых лучей и тепла[6].

Почвы различают по набору нутриентов, составу, увлажнению и вентиляции. Для каждого типа почвы характерен специфический состав бактерий. Так же важную роль играет климат, сезонность, произрастающие растения и множество иных условий. На поверхности имеется гораздо больше бактерий, чем на глубине в двадцать пять сантиметров [7].

На поверхности и в прилегающих к ней слоях, которые обогащены мертвиной и мертвыми останками растений, а так же прекрасно вентилируются, предпочитают жить бактерии, которым необходим кислород. На глубине, где прослеживается недостаток питания и кислорода, обитают анаэробы. Они не нуждаются в  $O_2$  [8].

Из земли бактерии переселяются на растения. На стеблях, листьях и цветах зачастую можно найти легко усвояемые углеводы и органику. На них падки молочнокислые бактерии [9].

В одном грамме почвы можно обнаружить коллосальное разнообразие бактерий. В состав, как правило, входит микрофлора, катализирующая гниение, бактерии, которые отвечают за нитрофикацию и способные улавливать атмосферный азот. Так же в этот ряд можно включить актиномицетов, микроскопических представителей Царства Грибы, и многочисленных простейших животных.

Наибольшей выживаемостью в земле отличаются бактериальные и грибные споры. Наиболее густо заселена почва на глубине пяти-десяти сантиметров. Бактерии способны катализировать минерализацию трупов. Они образуют гуминовые кислоты. От этого зависит плодородность [10].

В случае заражения пищи почвенными бактериями, может привести к тяжелейшим заболеваниям для людей [11].

## **1.2 Микрофлора и человек**

В настоящее время, ученые склонны воспринимать микрофлору человека в качестве отдельного специализированного органа. Этому органу присуще огромное количество функций. Все это, безусловно, отражается на человеческом здоровье, самочувствии и благополучии [4].

Современной идентификации микрофлоры, обитающей на человеке, помогает технологический прогресс. В частности, молекулярная биология.

Основной мишенью исследования являются 16S рибосомальные РНК-гены с последующим сравнением с известными базами данных [12].

Входными воротами для бактерий, обитающих в окружающем мире, является рот, а так же слизистые и раны на теле.



Некоторые непатогенные бактерии живут внутри человека и не причиняют ему неприятностей. Они обеспечивают нормальную жизнедеятельность организма. Например, бактерии, которые живут в толстой кишке, необходимы для выработки иммунитета, витаминов и осуществления пищеварения.

Дисбактериоз является опасным для здоровья человека состоянием. Это дает пространство для заселения ЖКТ вредными для организма микробами. Они могут становиться причиной кишечных инфекций [13].

Многочисленные инфекции животных и человека являются следствием заражения патогенной микрофлорой.

Инфекции являются следствием работы патогенных бактерий. Такие болезни передаются воздушно-капельным или бытовым путем. Разносчиками заболеваний могут быть животные и членистоногие.

Инфекции классифицируют на:

- Кожно-венерические;
- Кровяные;
- Кишечные;
- Воздушно-капельные [14].

Ряд болезней достается нам от сельскохозяйственных продуктов и животных-производителей. Такие болезни именуется зоонозами. Между самими людьми, они передаются крайне редко [15].

### **1.3 Методы идентификации микроорганизмов**

Идентификация микроорганизмов – это определение видовой или родовой принадлежности на основании изучения биохимических, культурально-морфологических, патогенных, серологических и генетических свойств определенного образца. Критерием для идентификации является наличие у микроба совокупности основных признаков, характерных для

данного вида таксонометрических признаков. Задачам ускорения, упрощения и удешевления наиболее трудоемкого этапа - идентификации культур - служат широко распространенные в настоящее время полуавтоматизированные и автоматизированные системы для идентификации, выпускаемые как за рубежом, так и в нашей стране, а также методы молекулярно-генетической идентификации [16].

При идентификации культур проводят определение их родовой и видовой принадлежности, а при необходимости и внутривидовое типирование. Результат получают по совокупности данных:

1. Морфологических, основанных на выявлении характерных особенностей ультраструктуры возбудителя и их тинкториальных свойств (чаще окраска по Граму);

2. Культуральных, основанных на выделении чистой культуры микроорганизмов на плотной питательной среде, с изучением особенностей выросших колоний;

3. Биохимической активности культур. В том числе: оксидазной и каталазной активности, способности ферментировать углеводы

4. Иммунологических, основанных на выявлении антигенов (АГ) возбудителя или антител (АТ) к ним. Идентификацию возбудителей по их антигенным свойствам проводят в реакциях ориентировочной агглютинации, ко-агглютинации, латексной агглютинации, преципитации или иммунофлюоресценции (прямой или непрямой).

5. Молекулярно-генетических, основанных на определении специфических нуклеотидных последовательностей в цепи ДНК при помощи короткой эталонной цепи ДНК (праймера). С этой целью используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР), лигазную цепную реакцию и их модификации, метод генетических зондов, сэндвич-гибридизацию [17].

## **1.4 Ген 16S рРНК**

Ген 16S рРНК, именуемый учеными эволюционным хронометром, является удобным инструментом для изучения эволюционных процессов и филогенетической систематики.

Данный феномен основывается на том, что этот ген присутствует абсолютно во всех известных человечеству бактериальных геномах. В генетическом аппарате вирусов и в ядерных организмах его нет.

Ген 16S рРНК присутствует в митохондриях. Этот ген состоит из вариативных и консервативных участков [24, 25]. Универсальные праймеры способны садиться на консервативные домены при проведении ПЦР. Вариативные предназначены для видовой идентификации [26].

Базы данных наподобие GenBank совершенно безвозмездно предоставляют исследователям информацию о нуклеотидных последовательностях маркерного гена. Это является большим подспорьем для видовой идентификации бактерий [27]

В настоящее время запущена фундаментальная пестройка старой классификации микроорганизмов, основанная на фенотипических признаках.

Современная систематика должна основываться на данных, полученных благодаря достижениям молекулярной биологии [28].

## **1.5 Применение ПЦР**

С помощью ПЦР ученые научились амплифицировать ничтожно-малые содержания ДНК в препаратах. Это позволяет увеличить пробы. ПЦР работает наподобие молекулярного ксерокса [18].

В настоящее время есть два общепринятых метода исследования нуклеотидных последовательностей: снятие отпечатков ДНК и ПЦР.

Ученые используют полимеразную цепную реакцию в тех случаях, когда содержание ДНК недостаточно или препарат подвергся слишком сильному разрушению и не годится для взятия отпечатков.

Для взятия отпечатков необходимо располагать протяженными нитями ДНК. ПЦР пригодна для изучения препаратов, характеризующихся нестабильной индивидуальной вариативностью [19].

Пожалуй, ПЦР наиболее часто применяют для нужд медицинской микробиологии, являющейся одной из многочисленных ветвей клинической диагностики. После введения в методику исследования метода ПЦР, который является достойным конкурентом для серологической практики, удалось значительно расширить потенциал такого направления как клиническая микробиология. Тем не менее, основной костяк исследований в данном направлении до сих пор принадлежит методам выделения и выращивания бактерий на ненатуральных питательных средах или в культурах клеток *in vitro* [20].

В случае, если определение патогенных бактерий производится традиционными методами, к примеру, задействован иммуноферментный анализ, который способен идентифицировать маркерные белки, которые продуцируются возбудителями инфекций, задействован опосредованный метод идентификации патогена. Генетический анализ при помощи ПЦР прямо сигнализирует о патологической бактериальной микрофлоре [21].

Благодаря ПЦР лаборантом удастся сильно ускорить и оптимизировать идентификацию наследственных и инфекционных болезней.

Подозрительный ген амплифицируют ПЦР (для этого нужны специфические праймеры), а затем секвенируют ради того, чтобы установить тип мутационной изменчивости.

ПЦР способна выдавать готовый результат исследования через сутки-двое.

Традиционный способ бактериальной идентификации бактерий основан на широком спектре фенотипических характеристик. Организмы разделяли на

группы на основе морфологических и физиологических признаков. Эти признаки включают специфические потребности в питании и условиях роста, форму клеток и многое другое. В данное время эти признаки стали одинаковыми для многих видов и, следовательно, потеряли свою уникальную специфичность. У традиционного метода идентификации есть и другие недостатки: идентификация требует проведения большого количества трудоемких тестов, а также стандартизация результатов сильно колеблется между лабораториями, что может быть дополнительным источником ошибок. Относительная доступность и простота использования бактериальной генетической информации стала новым шагом в бактериальной систематике. Основополагающую роль в этом процессе сыграла расшифровка последовательности гена 16S рРНК. Благодаря своей консервативной природе и простоте манипулирования, ген 16S рРНК широко используется для идентификации видов бактерий [22].

### **1.6 Очистка ДНК от ненужных сопутствующих компонентов после реакции амплификации**

Получение ампликонов и использование метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) является важным этапом в исследованиях геномов. После завершения ПЦР в реакционной смеси кроме затребованного продукта (ампликонов) остаются непрореагировавшие DNTPs, праймеры, пирофосфаты, DNA-полимераза. Все эти компоненты затрудняют дальнейшую работу с ампликонами. Для последующего использования ампликонов необходимо удаление данных продуктов и перенос DNA-ампликонов в новый буфер[23].

### **1.7 Рестрикция ДНК**

Рестриктазы являются ничем иным, как следствием эволюционного течения микроорганизмов. Они принимают непосредственное участие в работе

так называемой системы рестрикции-модификации, характерной для всех бактерий.

Эта система выполняет функцию иммунитета для бактериальной клетки и способна защищать бактерии от пролиферации чужеродной ДНК.

Данная система функционирует внутри бактериальной клетки, в частности, в цитоплазме и тем самым отличается от эукариотического иммунитета, который уничтожает чужеродные агенты превентивно, т. е. вне клеточно.

Метилирование остатков аденина и цитозина является природной защитой бактерий. Чужая ДНК, у которой метелирование стоит на других позициях, уничтожается эндонуклеазными рестриктазами [29].

Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы — группа энзимов (гидролазы), запускают разрушение гидролиз фосфодиэфирных связей между нуклеотидами, Эта системы сходна с функциями, которые несет иммунитет. Эти энзимы «узнают» специфические сайты рестрикции в двунитиевой молекуле ДНК.

Рестриктазы работают с серединными фрагментами ДНК и тем самым отличаются от экзонуклеаз. Их специфика состоит в том, что они расщепляют концевые участки молекулы ДНК.

В настоящее время существует 4000 эндонуклеаз рестрикции. 600 из них являются объектом коммерции и применяются в клинических лабораториях для молекулярно-биологических исследований [30].

Энзимы рестрикции разрезают цепь ДНК на небольшие кусочки, которые впоследствии удобно визуализировать посредством электрофоретических методов.

С применением электрофореза в агарозном геле куски молекулы ДНК, которые можно различать по длине, можно легко визуализировать и изучать по отдельности.

Небольшие фрагменты ДНК движутся по гелю гораздо проворнее, чем большие.

В процессе окраски геля используют красители, которые способны взаимодействовать с ДНК.

Тем самым визуализируется электрофоретическая лестница, по которой можно установить рестрикционную картину произведенного анализа.

Получившиеся электрофореграммы читаются с использованием откалиброванных ДНК-маркеров с известной молекулярной массой [31].

Все энзимы проявляют наибольшую активность в строго специфических условиях.

Для рестриктаз чрезвычайно важна температура хранения и эксплуатации, а так же тип буферного раствора [32].

Буферы, в присутствии которых идет реакция рестрикции, поставляются производителями в концентрированном виде. Их надлежит хранить в морозильной камере при очень низких температурах и разбавлять до требуемой концентрации непосредственно перед употреблением [33].

Первую рестриктазу выделили в одна тысяча девятьсот шестьдесят восьмом году [34].

## **1.8 Электрофорез ДНК**

Электрофорез позволяет разделять набор нуклеотидных фрагментов под воздействием электрического поля. Молекулы движутся в направлении от «плюса» к «минусу» [35].

Важность электрофореза для прикладной химии и биологии сложно переоценить [36].

В семидесятых годах прошлого столетия ученые выяснили, что гель-электрофорез способен визуализировать длину и чистоту молекул ДНК, а также составлять исследуемые фрагменты в электрофоретическую лестницу, удобную для дальнейшего анализа.

Данный метод довольно прост для использования.

Полиакриламидный гель отличается довольно узкими порами, поэтому для целей молекулярной биологии были предложены гели, имеющие в своей основе агарозу. Ее добывают из водорослей.

Проведения электрофореза в агарозном геле является стандартным методом для большого количества лабораторных тестов, связанных с изучением ДНК.

Этот метод позволяет ускоренно и эффективно разделить смеси фрагментов ДНК, которые не под силу разъединить с помощью других методов.

Электрофорез проводится в камере, заполненной буферным раствором. Буфер необходим для повышения ионной силы раствора, в котором будет происходить разделение молекул ДНК. Он же используется для приготовления агарозного геля [37].



## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Объекты исследования**

Образцы почвенных бактерий были получены от Демьянчук Дарьи, магистранта кафедры биотехнологии ИФБиБТ

### **2.2 Методика выделения ДНК**

Выделение бактериальной геномной ДНК при помощи набора AxyPrepBacterialGenomicDNAminiprepKit основано на эффективном выходе геномной ДНК посредством специального лизисного буфера G-A. После этого быстрое отделение геномной ДНК от протеинов, полисахаридов и липидов достигается уникальным фазоразделительным шагом. Высокоочищенная геномная ДНК находится в нижней фазе. Затем раствор ДНК пропускают через фильтр, на котором оседают белки, липиды и полисахариды, а также клеточные стенки бактерий. Следующим шагом раствор ДНК наносят на колонку, где ДНК связывается с ней. Центрифугируют один раз после добавления промывочного буфера W1 и два раза после добавления буфера W2. Центрифугируют 2 минуты при 12000 оборотах. Это делают для того чтобы очистить ДНК от нежелательных молекул и солей, которые могли пройти через фильтр. Очищенная бактериальная ДНК элюируется с колонки TEбуфером. [40].

### **2.3 Проведение полимеразной цепной реакции**

При постановке реакции ПЦР для 11 проб сначала была приготовлена смесь с запасом на 13 образцов:

Для получения ампликонов ограниченных последовательностями праймеров:

500 L – 5'-CGTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3'

1350 R – 5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3'

- 390 мкл  $H_2$ (дист)
- 60 мкл 10×буфера
- 60 мкл dNTP (0,5 мМ водного раствора каждого)
- 30 мкл + 30 мкл праймеров (по 2  $\mu$ М водного раствора каждого)
- 30 мкл  $MgCl_2$  (50 мМ водного раствора)

Все компоненты смеси были смешаны в 1 пробирке. В отдельные 11 пробирок добавили по 46 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемой ДНК бактерий. Смесь готовили на ледяной подставке.

Taq полимеразу добавить в последнюю очередь по 2 мкл.

Программа ПЦР:

1. 95°C – 4:00 мин;
2. 95°C – 0:16 сек;
3. 58°C – 0:22 сек;
4. 72°C – 0:22 сек;
5. G T 2 36 times;
6. 72°C fr 6:30 мин;
7. 4°C – 18:00:00;
8. END.

Аmplification проводила на приборе Vi-rad - MJ Mini Personal Thermal Cycler.

#### **2.4 Проведение реакции рестрикции**

Реактивы: очищенные образцы ДНК исследуемых бактерий с помощью набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit. вода, буферные растворы фирмы «Сибэнзим», рестриктаза Sse9 I. Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 4 ч. в соответствующем буфере фирмы «Сибэнзим» с последующей визуализацией результатов с помощью электрофореза в агарозном геле.

Рестриктазы имеют тетра-нуклеотидный сайт узнавания, что позволяет получать от 3 до 7 фрагментов ДНК в результате расщепления продукта амплификации, имеющего длину порядка 900 пар нуклеотидов (таблица 1).

Таблица 1 - Сайты узнавания рестриктаз

Рестриктаза	Сайт узнавания
BspFI I	CG <sup>^</sup> CG GC <sup>^</sup> GC
Msp I	C <sup>^</sup> CGG GGC <sup>^</sup> C
Rsa I	GT <sup>^</sup> AC CA <sup>^</sup> TG
Tag I	T <sup>^</sup> CGA AGC <sup>^</sup> T
BstMB I	GG <sup>^</sup> CC CC <sup>^</sup> GG
Sse9 I	<sup>^</sup> AATT TTAA <sup>^</sup>
BstHI I	GCG <sup>^</sup> C C <sup>^</sup> GCG

## 2.5 Проведение электрофореза

Реактивы:

- 0,85 г порошка агарозы
- 50 мл электрофорезного буфера TAE
- ДНК - маркеры (100bp)
- 6 x буфер для нанесения пробы (ксиленцианол FF, метиленовый синий, глицерин и вода)
- Дистиллированная вода
- Образцы ДНК микроорганизмов

Необходимое оборудование для проведения электрофореза:

1. Источник питания Vi-Rad PowerPac HV (1-400 Вт, 0,01-500 мА, 20-5000 В)
2. Камера для горизонтального электрофореза (гель 7x10) Mini-Sub Cell GT, Vi-Rad.
3. Гель-документирующая система Vi-Rad Gel Doc XR с компьютером.

Для проведения горизонтального электрофореза готовят пластину агарозного геля, представляющей собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере (в трис-баратном) агарозу в концентрации 1.7%. Застывшая агароза образует пространственную решетку. При заливке с помощью гребенки формируем в геле специальные лунки, в которые, после затвердевания геля, вносят продукты амплификации. Далее, пластина геля помещается в аппарат для горизонтального гель-электрофореза (гель 7x10 Mini-SubCell GT, Bio-Rad) и подключается источник постоянного напряжения (Bio-Rad PowerPac) - 85V в течении 2ч. По окончании разделения подложку с гелем извлекаем из кюветы и помещаем гель вместе с подложкой в красящий раствор (0,5мг/л бромистого этидия, 20мин). После прокрашивания гель промывают в воде в течение 2 мин и переносят подложку в камеру трансиллюминатора гель-документирующей системы (Bio-Rad GelDoc XR с компьютером), излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне.

Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярной массы ДНК (100bp и 100bp+50 bp ДНК маркеры, НПО "СибЭнзим").

## **2.6 Методика анализа *in silico***

*In silico* – 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: теоретическую 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.

Был проведен рестрикционный анализ *in silico* ампликонов их генов 16S-рРНК с помощью программы pDRAW32. После теоретического рестриктирования ампликонов последовательностей 500L – 1350R и 8F-1492R взятых из базы данных GenBank [40] для каждого вида были построены рестрикционные профили.

## 2.7 Методики очистки ампликонов

Очистка ампликонов производилась 2 методами: С помощью набора DiatomDNAClean-UP для быстрой очистки ПЦР продукт.С использованием реактивов для очистки полученной ДНК из набора АхуPrepBacterialGenomic DNA MiniprepKit. Набор реагентов Diatom DNA Clean-UP основан на использовании солубилизирующего реагента(в соотношении пробы к солубилизируемому реагенту 1:3), в присутствии которого ДНК активно сорбируется на поверхности Nucleos сорбента – количество добавляемого сорбента зависит от количества ДНК в пробе(1:2 соответственно), время сорбции составляет 5-7 минут с последующей отмывкой спиртовым раствором(этанол), ДНК практически очищается от сопутствующих примесей : избытка праймеров, димеров-праймеров, dNTP, с дальнейшей элюацией с сорбента бидистиллированной водой. Очищенная таким методом ДНК может быть использована для дальнейшей рестрикции и секвенирования. Данный набор обеспечивает высокую чистоту очищенной ДНК – OD 260/280 – 1.6-2.0 и особенно эффективен при очистке ДНК размером от 200 до 20 000 п.н. Набор АхуPrepBacterialGenomic DNA MiniprepKit предназначен для очистки бактериальной ДНК и обеспечивает высокую чистоту очищенной ДНК - OD 260/280 – 1.6-2.0 и эффективен при очистке ДНК размером более 30 kb. Данный набор основан на использовании ДНК –связывающей колонки –Miniprepcolumn в присутствии ДНК-связывающего буфера (BV) – в соотношении: 10(ДНК)/4(буфер BV) с последующим центрифугированием и промывкой буферами W1 и W2:

- промывка буфером W1 и центрифугирование при 12,000об/мин. - 1 минуту с последующим удалением фильтрата;
- промывка буфером W2 и центрифугирование при 12,000об/мин. - 1 минуту с последующим удалением фильтрата;
- повторная промывка буфером W2;

Далее ДНК смывается с колонки элюентом. Оба способа позволяют очистить ампликоны с достаточной чистотой, однако набор AxyPrepBacterialGenomic DNA MiniprepKit специализированный на очистке бактериальной ДНК позволяет минимизировать потери ДНК при очистке.

### **3 Результаты**

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности со страницы 22 по 30, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Провела *in silico* анализ ARDRA предполагаемых видов бактерий. Выделила хорошие препараты ДНК. ПЦР привела к получению фрагментов 8F–1492R и 500L – 1350R гена 16S рРНК, которые проанализировала методом анализа ARDRA.

После анализа виртуальных и опытных результатов пришла к выводу, что исследованные образцы это: пробы 1, 5 - *Bacillus cereus*, 2 – *Bacillus toyonensis*, 3, 6, 7 - *Bacillus safensis*, 4, 8, 9 - *Bacillus velezensis*, 10 - *Pseudomonas koreensis*, 11 - *Klebsiella pneumonia*, 12 - *Agrobacterium tumefaciens*, 13 - *Escherichia coli*. Наличие *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumonia* в почве указывает на возможную загрязненность почвы в месте взятия проб из канализации.

Метод ARDRA, основанный на применении ПЦР с информативными рестриктазами удобен и не требует дорогостоящего оборудования идентификации микроорганизмов. Метод дешёвый и скорый.



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Перепелкина А.А., Влияние биологизации и применения прямого посева на микробиологические показатели почв: аспекты анализа / А.А. Перепелкина // В сборнике: Общество и личность: гуманистические тенденции в развитии современного общества Сборник научных статей преподавателей, обучающихся вузов, научно-практических работников. 2017. С. 443-446.
2. SujathaSrinivasan. The Human Vaginal Bacterial Biota and Bacterial Vaginosis/ SujathaSrinivasan and David N. Fredricks// Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases,2008. -Article ID 750479. – P. 22
3. Джеймс О`Д. Молекулярная клиническая диагностика. Методы:учебник/ Джеймс О`Д. Макги, СаймонХеррингтон. - Мир - 1999. - 596 с.
4. Дашковская А.Г., Анализ и тенденции развития мирового рынка оборудования ПЦР-диагностики / А.Г. Дашковская, С.Н. Мрыхин, П.Н. Дробот, С.В. Мельченко, А.С. Рафальский // В сборнике: Инноватика-2015 сборник материалов XI Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Под ред. А.Н. Солдатов, С.Л. Минькова. 2015. С. 162-167.
5. . Беляева, Е. А. Микробиота кишечника коренного жителя Центрального федерального округа РФ как основа для создания региональных пробиотических препаратов: дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.02.03 / Беляева Екатерина Андреевна. – Тверь,2014.- 125с.
6. Гусейнов, О. А. Методы биохимических исследований: учеб.-метод. пособие к лаб. занятиям / Сиб. федерал. ун-т; сост. О. А. Гусейнов. – Красноярск : СФУ, 2012. – 46 с.
4. Казаков В.С. Решения на базе MALDI-TF массспектрометрии для экспресс идентификации микроорганизмов. - 2017 г.
5. Мусина Л.Т. Физиология бактерий. Методические рекомендации, 2016. - 32с.

6. Лабинская, А.С. Руководство по медицинской микробиологии. Под ред.: Н.Н.Костюкова, С.М.Иванова.- Москва: БИНОМ, - 2012.
7. Шуб Г.М., Сумовская А.Е., Зырянов В.В. Автоматизированные методы индикации и идентификации микроорганизмов в экспресс-диагностике инфекций// Клиническая лабораторная диагностика -2016., № 5, С. 46-48.
8. Шабан Ж. Г.; Слизень В. В.; Канашкова Т. А.; Крылов И. А. Методы исследования в микробиологии Учебно-методическое пособие, Минск –БГМУ. – 2015.
9. . ПДРФ [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://lektsii.rg/15-79407.html>.
10. Алексеева А.А., Микробиологический статус агропочв лесных питомников Красноярского края / А.А. Алексеева // В сборнике: Инновационные тенденции развития российской науки мат-лы IX Международной научно-практической конференции молодых ученых. Ответственный за выпуск: В.Л. Бопп. 2016. С. 3-6
11. Shahriar S, Polymerase chain reactin (PCR)-based methds: Prmising mlecular tls in dentistry / Shahriar Shahi, Sepideh Zununi Vahed, Nazanin Fathi, Simin Sharifi // Internatinal Jurnal f Bilgical Macrmolecules Vlume 1171 ctber 2018, P 983-99
12. Rachel E.Kieser, Reverse Cmplment PCR: A nvel ne-step PCR system fr typing highly degraded DNA fr human identificatin /Rachel E.Kieser Magdalena M.Bus Jnathan L.Kinga Walter van der Vliet Jp Theelen Bruce Budwle // Frensic Science Internatinal: Genetics, Vlume 44, January 2020, 10220
13. Madic J., Three-clr crystal digital PCR (Трехцветный кристалл цифровой ПЦР) / J. Madic, A. Zcevic, V. Senlis, E. Fradet, M. E. Drniu // Bimolecular Detectin and Quantificatin Vlume 10December 2016 P 34-46.
14. Haidei .S., Regulatry-technical requirements f cnduct research gms by real time plymerase chain reactin / .S. Haidei, V.. Zahrebelniy, J.N.
15. Nvzhytska, N.V. Usachenk, N.L. Danilchenk // Ветеринарна біотехнологія. 2015. № 26 (26). С. 27-32.

16. Hendrik Schröder, Biochemical and Biophysical Research Communications (Биохимические и биофизические исследования связи) / Hendrik Schröder, Maximilian Grösche, Michael Adler, Mark Spengler, Christf M. Niemeyer // Volume 488, Issue 224 June 2017. P 311-315
17. Шустова М.И., Сравнение методик ПЦР-РВ и цифровой капельной пцр для измерения концентрации ДНК и РНК / М.И. Шустова, В.В. Петров // В книге: Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2020 Сборник материалов. Под редакцией: В.Г. Акимкина, М.Г. Твороговой. 2020. с. 274.
18. Наталья Кузьмина.Раздел :Генная инженерия: построение карт рестрикции [Электронный ресурс]/ Биотехнология - Режимдоступа [http://www.biotechnolog.ru/ge/ge4\\_1.htm](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge4_1.htm)
19. Цапалина Е.В., ПЦР, как экспресс метод диагностики инфекционных заболеваний / Е.В. Цапалина, Н. И. Молофеева, Д. А. Васильев // В сборнике: Студенческий научный форум - 2015 VII Международная студенческая электронная научная конференция, электронное издание. 2015.
20. Рышкель И.В., Влияние антропогенных факторов на микробиологическую активность почвы / И.В. Рышкель, О.С. Рышкель // В сборнике: Сахаровские чтения 2018 года: экологические проблемы XXI века материалы 18-й международной научной конференции: в 3 частях. под редакцией С.А. Маскевича, С.С. Позняка. 2018. с. 168-169.
21. Мухаметшина А.И., Анализ микробиологических показателей почв / А.И. Мухаметшина // В сборнике: Человек, экология, культура Сборник научных трудов по материалам Всероссийской студенческой научно-практической конференции. под редакцией Е.И. Тихомировой. 2016. с 149-154.
22. Выделение ДНК [электронный ресурс] – режим доступа : [http://elib.sfu-kras.ru/bitstream/handle/2311/32023/stepina\\_t.n.pdf?sequence=1](http://elib.sfu-kras.ru/bitstream/handle/2311/32023/stepina_t.n.pdf?sequence=1)
23. Давыдова О.К. Методы генетических исследований микроорганизмов: учебное пособие. – Оренбург: ОГУ, 2013. – с 132 .
24. GenBank [Электронный ресурс] : база данных - Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

25. Cornelis P. Expressing genes in different Escherichia coli compartments/ Cornelis P// Curr Opin Biotechnol. - 2000. - V. 11(5). – P.450-4.
26. Toft I. Recombinant DNA Technology in the Synthesis of Human Insulin[Электронный ресурс] /Toft I. // Little Tree Pty. Ltd. - 1994.- Режим доступа:<http://www.littletree.com.au/dna.htm>
27. Гусев М. В., Минеева Л. А. Микробиология/ Гусев М. В., Минеева Л. А. — Москва: Академия, 2003. — 464 с
28. Thanbichler M. The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure/ Thanbichler M, Wang S, Shapiro L// J Cell Biochem . – 2005. – V.96 . – P. 501-21
29. Woese C. R. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA/ Woese, C. R., G. E. Fox, L. Zablen //Nature. – 1975. – V. 254. – P.83–86.
30. Woese, C. R. Bacterial evolution/ Woese, C. R// Microbiol. Rev. – 1987. – V.51. – P.221–271.
31. Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул: учебник/ Гааль Э., Медьеша Г., Верецкей Л. - Москва: Мир, 1982 -447с.
32. RFLP Method - Restriction Fragment Length Polymorphism[Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/RFLP.html>
34. Габидуллин Ю.З. Особенности некоторых свойств, определяющих патогенный потенциал сокультивируемых вариаций бактерий родов Enterobacter, Citrobacter, Serratia, E.Coli, Proteus: дис. на соискание ученой степени доктора мед. наук: 03.02.03/ Габидуллин Юлай Зайнуллович. – Уфа, 2014. – 314с.
35. Воробьев А.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник/ Воробьев А.А. - Москва: медицинское информационное агентство, 2004.- 690 с
36. Зеленин К. Н. Нобелевские премии по химии за 100 лет/ Зеленин К. Н. , Ноздрачев А. Д. , Поляков Е. Л. – СПб. : Гуманистика, 2003. 872 с
37. Bentley R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria/ Bentley R, Meganathan R// Microbiol. Rev. - 1982. - V. 46 (3) – P. 241–280.

38. Richard L. Vogt. Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef/ Richard L. Vogt and Laura Dippold// Public Health Rep. – 2002. - V.120 (2). - P.174–176.
39. Claire E Dawson .Phenotypic and molecular characterisation of Brucella isolates from marine mammals/ Claire E Dawson , Emma J Stubberfield , Lorraine L Perrett// BMC Microbiology,2008. – V.8. – P.224
40. Методика выделения ДНК [электронный ресурс] - Режим доступа : <https://www.vniimk.ru/uplad/162-167.pdf>

## ПРИЛОЖЕНИЕ

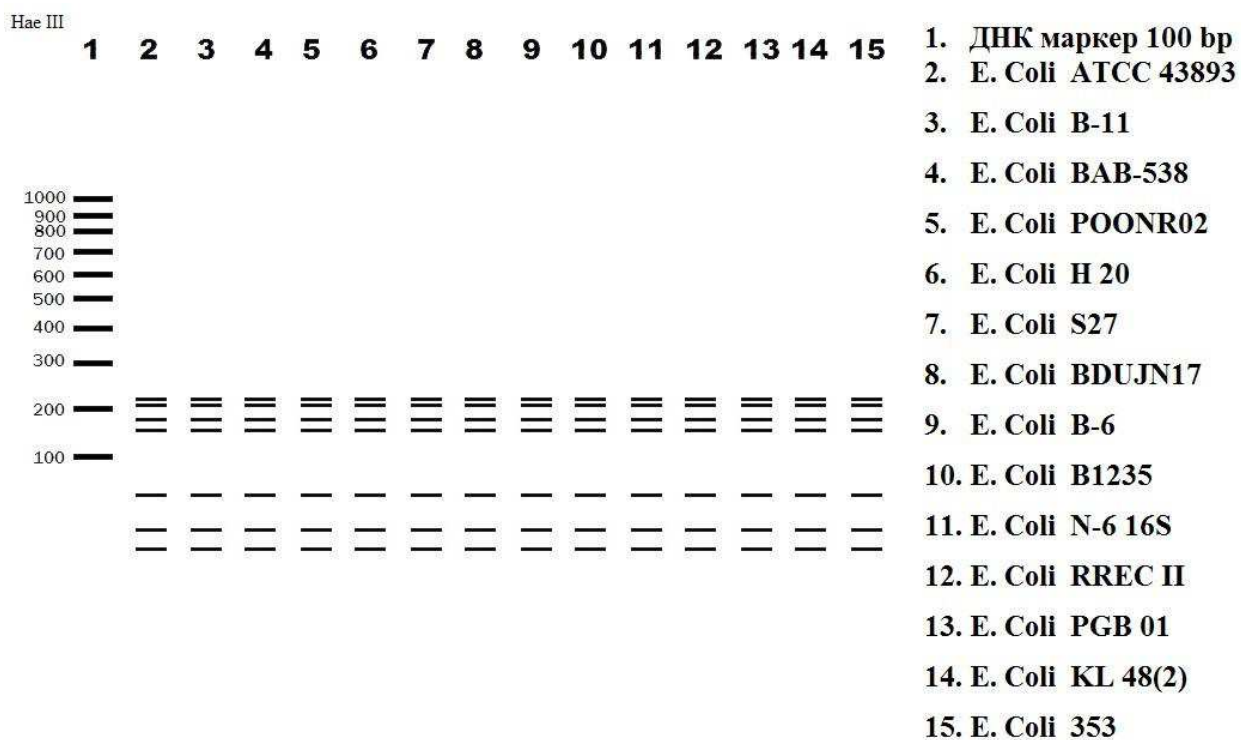


Рисунок 12 - Теоретическая рестрикция ампликонов разных штаммов гена 16S рРНК *E.coli* после обработки рестриктазой Haе III

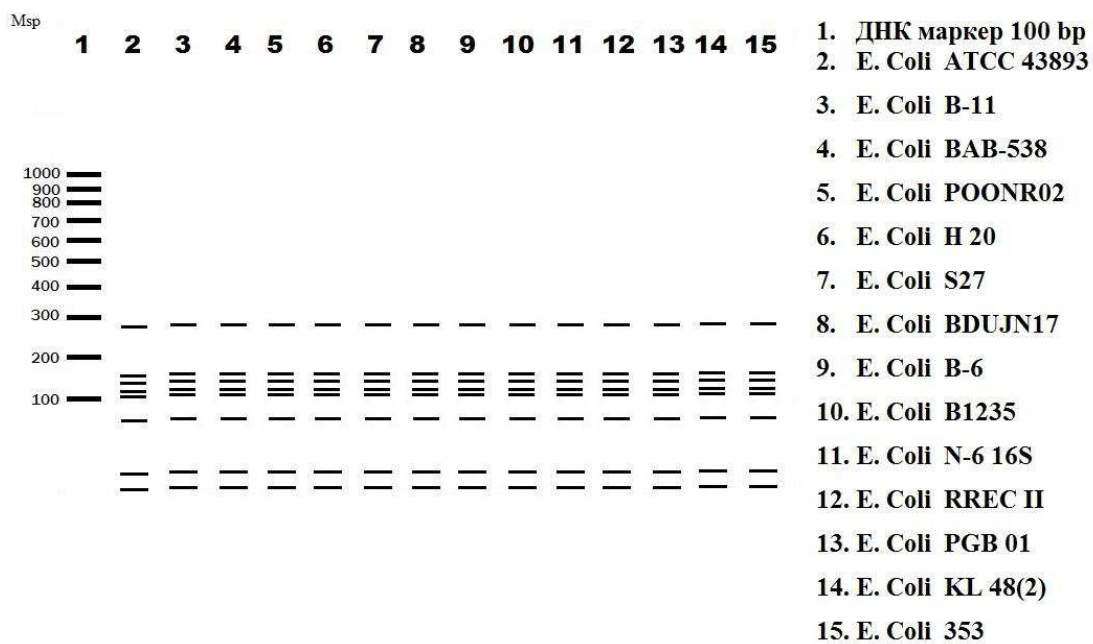


Рисунок 13 - Теоретическая рестрикция ампликонов разных штаммов гена 16S рРНК *E.coli* после обработки рестриктазой Msp I

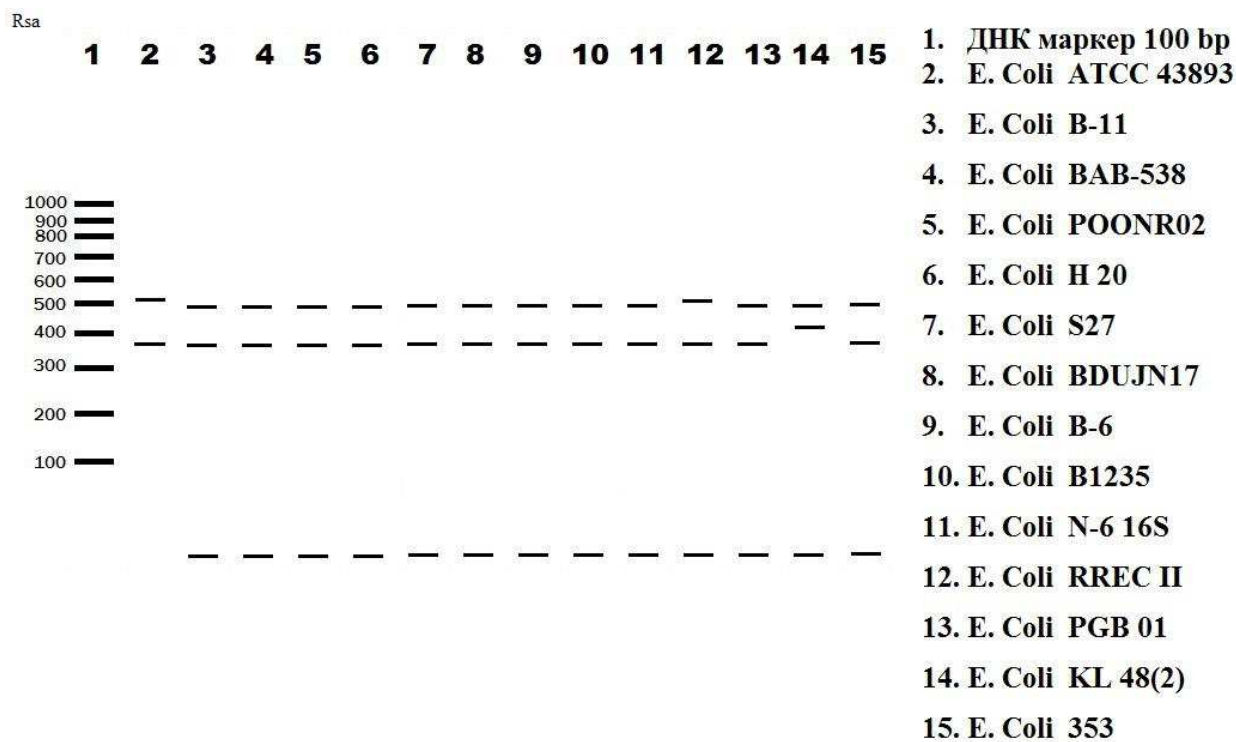



Рисунок 14 - Теоретическая рестрикция ампликонов разных штаммов генов 16s РНК *E.coli* после обработки рестриктазой Rsa I



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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой  
 Е. И. Шишацкая

«25» июня 2020 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

«Применение ПЦР в изучении микрофлоры»

Научный руководитель

 доцент, к.б.н.

О. А. Гусейнов

Выпускник

 24.06.20

Е. Л. Панченко

Красноярск 2020