

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

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
Е. И. Шишацкая  
подпись инициалы, фамилия  
« 16 » июня 2016 г

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

«Использование метода полиморфизма длин рестрикционных  
фрагментов для идентификации микроорганизмов»

06.04.01 - Биология

06.04.01.00.05 - Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель	<u>Аус</u> подпись, дата	<u>доцент, канд. биол. наук</u> должность, учёная степень	<u>О. А. Гусейнов</u> инициалы, фамилия
Выпускник	<u>Александр</u> подпись, дата		<u>Т. Н. Кузнецова</u> инициалы, фамилия
Рецензент	<u>С. И. В.</u> подпись, дата	<u>доцент канд. биол. наук</u> должность, учёная степень	<u>Л. С. Смирнова</u> инициалы, фамилия

Красноярск 2016

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме "Использование метода анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для идентификации микроорганизмов" содержит 71 страницу текстового документа, 37 иллюстраций, 9 таблиц, 79 использованных источников.

Ключевые слова: 16S-рРНК, бактерии-деструкторы ПГА, метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Цель работы: Используя метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, идентифицировать видовую принадлежность бактерий-биодеструкторов ПГА и определить применимость этого метода.

В задачи исследования входило:

1. Из биомассы бактерий-биодеструкторов ПГА выделить ДНК и получить ампликоны гена 16S-рРНК используя пары праймеров 500L – 1350R и 8F – 1492L

2. Для полученных ампликонов провести реакции рестрикции используя рестриктазы Hra II, Hae III, Taq I, Hha I, Sse9 I, Mbo I, BspFN I, Afa I.

3. Провести электрофорез продуктов рестрикции и проанализировать полученные электрофореграммы.

4. Провести анализ *in silico* ампликонов 500L – 1350R и 8F – 1492L гена 16S-рРНК методом анализа ПДРФ с использованием баз данных GenBank, и построить теоретические электрофореграммы.

5. Сравнить теоретические и практические электрофореграммы и сделать вывод о видовой принадлежности бактерий.

6. Используя полученные секвенированные последовательности ампликонов гена 16S-рРНК образцов бактерий провести определение вида наших образцов с использованием баз данных GenBank и сравнить с результатами полученными методом анализа ПДРФ.

Используя ПЦР были получены ампликоны размером около 900 и 1500 п.о. гена 16S-рРНК. Проведен рестрикционный анализ исследуемых ампликонов. Полученные данные были сверены с результатами анализа *in silico* и результатами секвенирования. По результатам исследуемые бактерии оказались представителями видов: *Arthrobacter globiformis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Achromobacter xylooxidans*, *Roseovarius tolerans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*. Данные секвенирования подтвердили полученные нами результаты.

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>7</b>
1.1 Биоразлагаемые пластики – полигидроксиалканоаты.....	7
1.2 Генетическая система бактерий.....	8
1.3 Дезоксирибонуклеиновая кислота.....	10
1.4 Идентификация бактерий .....	11
1.5 Ген 16S-рибосомальной РНК .....	13
1.6 Полимеразная цепная реакция .....	14
1.7 Рестрикция ДНК.....	17
1.8 Электрофорез ДНК.....	20
1.9 Полиморфизма длин рестрикционных фрагментов .....	25
1.10 Секвенирование последовательностей ДНК.....	26
1.11 Анализ <i>in silico</i> .....	28
<i>In silico</i> – термин, обозначающий компьютерное моделирование (симуляцию) эксперимента, чаще биологического. Фраза была создана по аналогии с фразами <i>in vivo</i> (в живом организме) и <i>in vitro</i> (в пробирке), которые часто используются в биологии. ....	
Применение биоинформационного подхода позволяет планировать и моделировать эксперименты для того что бы снизить вероятность ошибки в ходе практического эксперимента, а также снизить количество ресурсов. ....	
1.12 Используемые образцы бактерии .....	29
<b>2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>31</b>
2.1 Объекты исследования .....	31
2.2 Методика выделения ДНК .....	31
2.2 Проведение полимеразной цепной реакции.....	32
2.4 Проведение реакции рестрикции .....	34
2.5 Проведение электрофореза .....	36
2.6 Методика очистки ДНК ампликонов .....	37
<b>3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>	<b>38</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТЬ .....</b>	<b>39</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>40</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>	<b>41</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Исследование микроорганизмов невозможно без распознавания их принадлежности к тем или иным биологическим родам и видам. Процесс идентификации является одним из самых важных и трудоемких этапов проведения биологических исследований.

Ранние работы по классификации бактерий основывались в основном на морфологических и физиологических признаках при изучении чистых культур. В последние 20 лет возможности для идентификации бактерий существенно расширились в связи с использованием молекулярно-генетических методов [1].

Наибольший прогресс в реконструкции филогении микроорганизмов был достигнут благодаря секвенированию различных маркерных генов. В частности, секвенирование гена 16S-рРНК, а также анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов маркерных ампликонов позволили пересмотреть систематические взаимоотношения между разными бактериями [2, 3].

Применение молекулярно-биологического подхода для идентификации микроорганизмов выявило его принципиальные преимущества по сравнению с традиционным фенотипическим подходом: оно открыло возможность идентифицировать некультивируемые организмы. Появилась возможность с помощью единой методологии осуществлять построение филогенетических систем [4].

Промышленная революция, начавшаяся в Европе в XVIII веке, внесла существенные изменения во взаимоотношения Природы и человека. Человеческая деятельность меняет характер окружающей среды, причем в большинстве случаев, эти изменения оказывают негативное влияние на окружающую среду. Но в то же время любая деятельность - промышленная,

сельскохозяйственная, рекреационная - источник жизни человека, основа его существования.

Одной из экологических проблем является загрязнение окружающей среды пластиковыми отходами. Процесс накопления продуктов из пластмасс в окружающей среде, отрицательно сказывается на среде обитания диких животных, а также приводит к их гибели [5].

Решением этой проблемы стала разработка биоразлагаемых пластиков – полигидроксиалканоатов (ПГА). Данный вид пластика получают при помощи бактерий, и они же участвуют в его деградации [6]. По свойствам ПГА напоминают полипропилен, один из самых популярных пластиков, поэтому сегодня активно ведутся исследования возможности их наработки в промышленных масштабах.

Но для того чтобы использовать данный вид пластика нужно изучить микробную составляющую окружающей среды как главного агента биodeградации полимера.

Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) маркерных ампликонов является одним из наиболее малозатратных, быстрых и достоверных методов идентификации бактерий. В то время как для идентификации некоторых микроорганизмов требуется несколько суток, а то и недель, а используя метод анализа ПДРФ результат можно получить в течении дня.

В данной работе показана применимость метода анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для идентификации микроорганизмов на примере ПГА деградирующих бактерий.

**Цель работы:** Используя метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, идентифицировать видовую принадлежность бактерий-биодеструкторов ПГА и определить применимость этого метода.

Исходя из данной цели, были поставлены следующие **задачи**:

1. Из биомассы бактерий-биодеструкторов ПГА выделить ДНК и получить ампликоны гена 16S-rРНК используя пары праймеров 500L – 1350R и 8F – 1492L
2. Для полученных ампликонов провести реакции рестрикции используя рестриктазы Hra II, Hae III, Taq I, Hha I, Sse9 I, Mbo I, BspFN I, Afa I.
3. Провести электрофорез продуктов рестрикции, проанализировать полученные электрофореграммы.
4. Провести анализ *in silico* ампликонов 500L – 1350R и 8F – 1492L гена 16S-rРНК методом анализа ПДРФ с использованием баз данных GenBank, и построить теоретические электрофореграммы.
5. Сравнить теоретические и практические электрофореграммы и сделать вывод о видовой принадлежности бактерий.
6. Используя полученные секвенированные последовательности ампликонов гена 16S-rРНК образцов бактерий провести определение вида наших образцов с использованием баз данных GenBank и сравнить с результатами полученными методом анализа ПДРФ.

Работа выполнена на кафедре Медицинской биологии в Институте Фундаментальной Биологии и Биотехнологии; ЦКП "Геномика" СО РАН Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Биоразлагаемые пластики – полигидроксиалканоаты

Биоразлагаемые пластики это пластмассы, которые разлагаются под действием живых организмов, как правило, бактерии. Одним из перспективных биополимеров являются микробные полигидроксиалканоаты.

ПГА являются биополимерами ациклических гидроксикислот, которые синтезируются многими прокариотическими микроорганизмами в специфических условиях несбалансированного роста, при избытке углеродного и энергетического субстрата в среде и дефиците минеральных элементов (азота, серы, фосфатов и др.), а также кислорода. Среди наиболее перспективных продуцентов ПГА известны виды *Azotobacter*, *Bacillus*, *Methylmonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*. ПГА нашли применение в производстве упаковки одноразового пользования (продукты бытовой химии, личной гигиены и пищевая упаковка), медицине и фармакологии, сельском хозяйстве [7].

Для использования ПГА в промышленных масштабах делают необходимым изучение способности окружающей среды к самоочищению от этого вида биологической продукции. Разрушаемость ПГА зависит от многих составляющих, включая собственно химический состав и структуру полимера, микробную составляющую биоты как главного агента их биodeградации, а также условий среды, которые, в свою очередь, определяются биологическими, гидрохимическими, климатическими и погодными условиями [8].

## 1.2 Генетическая система бактерий

Генетический аппарат, или нуклеоид, является эквивалентом ядра у бактерий. Нуклеоид, состоит из одной замкнутой в кольцо или линейной молекулы ДНК. Структура ДНК представлена антипараллельной двойной правозакрученной спиралью [9].

ДНК прокариот имеет существенные отличия в структурной организации от эукариотической ДНК: нуклеоид бактерий не имеет ядерной оболочки, ядрышка и основных белков гистонов (имеются гистоподобные белки - HU, H-NS, IHF, которые участвуют в компактизации ДНК). Геном компактен, количество некодирующих последовательностей ДНК минимально (гены не несут интронов (за исключением архебактерий)). Гены – дискретные участки на ДНК, отличаются числом и специфичностью последовательности нуклеотидов, в которых зашифрована информация о структуре и свойствах белков. Каждому белку соответствует свой ген. Для кодирования белков часто используются 2 или 3 рамки считывания одной и той же последовательности ДНК, что повышает кодирующий потенциал генома без увеличения его размера [10]. В клетках бактерий и архей кольцевые или линейные молекулы ДНК прикреплены изнутри к клеточной мембране. Вся ДНК клетки (и хромосомная, и плазмидная) образует геном клетки. Обычно в бактериальной клетке содержится одна хромосома, но бывает и несколько. Длина бактериальной ДНК около 5 млн. п.н., молекула ДНК в развернутом виде может достигать более 1 мм, то есть почти в 1000 раз превышать длину бактериальной клетки. Было установлено, что хромосомы прокариот представляют собой высокоупорядоченную структуру, часть ДНК в этой структуре представлена системой из 20 - 100 независимо суперспирализованных петель. Хромосомы большинства прокариот имеют молекулярную массу в пределах 1-10<sup>9</sup> - 3-10<sup>10</sup> Да. Содержание пар оснований А+Т и Г+Ц в молекуле ДНК является постоянным для данного вида организма и служит важным диагностическим признаком [11].



Второй компонент бактериального генома – это плазмиды. Плазмиды – кольцевые молекулы ДНК длиной до нескольких тысяч пар оснований. Число их в каждой клетке колеблется. [12]. Плазмиды – автономно реплицирующиеся внехромосомные генетические элементы. Как правило, они представляют собой кольцевые молекулы ДНК. В отличие от хромосом плазмиды являются «необязательным» генетическим материалом, потеря которого не приводит к гибели клетки. Однако многие крупные плазмиды содержат гены, кодирующие важные для клетки функции, которые могут оказаться необходимыми в определенных экологических условиях. Приобретаемые с плазмидами новые признаки в ряде случаев определяют названия плазмид: например, F-плазида (fertility factor), придающая клеткам донорные свойства, или R-плазида, определяющая резистентность клеток к антибиотикам [13].

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

### 1.3 Дезоксирибонуклеиновая кислота

Молекула ДНК – полимер, состоящий из двух цепочек нуклеотидов. Каждый нуклеотид содержит три химически различных компонента: гетероциклическое азотистое основание (аденин, тимин, гуанин и цитозин), моносахарид (дезоксирибоза) и остаток фосфорной кислоты [15, 16]. Связи между нуклеотидами в цепи образуются за счёт дезоксирибозы и фосфатной группы (фосфодиэфирные связи). Пентозу соединяет с основанием N-гликозидная связь, образованная C1-атомом пентозы (дезоксирибозы) и N1-атомом пиримидина или N9-атомом пурина

Исходя из структуры молекул, основания, входящие в состав нуклеотидов, разделяют на две группы: пурины (аденин [А] и гуанин [Г]) образованы соединёнными пяти- и шестичленным гетероциклами; пиримидины (цитозин [С] и тимин [Т]) — шестичленным гетероциклом [17]. Каждое основание на одной из цепей связывается с одним определённым основанием на второй цепи. Такое специфическое связывание называется комплементарным. Пурины комплементарны пиримидинам (то есть способны к образованию водородных связей с ними): аденин образует связи только с тимином, а цитозин — с гуанином [18].

1. Количество аденина равно количеству тимина, а гуанина — цитозину:  $A = T, G = C$ .

2. Количество пуринов равно количеству пиримидинов:  $A + G = T + C$ .

3. Количество оснований, содержащих аминогруппу в положении 4 пиримидинового и 6 пуринового ядер, равно количеству оснований, содержащих в этом же положении оксогруппу:  $A + C = G + T$ .

4. Количество комплементарных оснований  $A + T$  и  $G + C$  у разных видов живых организмов различно.

5. Отношение суммы комплементарных оснований  $\frac{\Sigma(G + C)}{\Sigma(A + T)}$  является важнейшей характеристикой ДНК, как показатель специфичности её нуклеотидного состава [19].

В двойной спирали различают малую (12 Å) и большую (22 Å) бороздки. Белки, например, факторы транскрипции, которые присоединяются к определённым последовательностям в двухцепочечной ДНК, обычно взаимодействуют с краями оснований в большой бороздке, где те более доступны [20].

Так как водородные связи нековалентны, они легко разрываются и восстанавливаются. Цепочки двойной спирали могут расходиться как замок-молния под действием ферментов (хеликазы) или при высокой температуре. Разные пары оснований образуют разное количество водородных связей. АТ связаны двумя, ГЦ — тремя водородными связями, поэтому на разрыв ГЦ требуется больше энергии. Процент ГЦ-пар и длина молекулы ДНК определяют количество энергии, необходимой для диссоциации цепей: длинные молекулы ДНК с большим содержанием ГЦ более тугоплавки [21, 22].

#### 1.4 Идентификация бактерий

Бактерии формируют многочисленные виды и благодаря своей природе многовариантны и, как следствие, значимы в современной человеческой цивилизации. Бактерии также отличаются своей многогранностью, и люди пытаются использовать этот феномен в своей практической жизни. Бактерии активно используются в разных отраслях промышленности (металлургической, пищевой, фармацевтической, сельскохозяйственной) [23]. Некоторые виды являются важнейшими представителями микробиоты организма человека необходимые для поддержания гомеостаза системы «человек - окружающая среда» (бактерии родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*) [24]. Но, несмотря на положительные качества, бактерии могут вызывать тяжелые заболевания [25]. Поэтому очень важно правильно идентифицировать микроорганизмы.

Идентификация микроорганизмов базируется на изучении морфологических, цитологических, культуральных, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических свойств.

Начиная с постулатов Коха идентификация бактерий сводилась в выделение чистых культур с последующей идентификацией фенотипическими тестами, к основным из которых можно отнести микроскопию по Грамму и анализ ферментации углеводов. Данные методы не всегда пригодны для точного и достоверного определения бактериальных патогенов так как: в бактериологической практике встречаются культуры, биохимический профиль которых не соответствует характеристикам предполагаемого рода или вида; не все бактерии растут на средах используемых при анализе ферментации углеводов; достоверная идентификация редко встречаемых видов бактерий требует наличие химических реагентов или иммунологических тестов, которые могут быть недоступны. В практику вошли новые методы, основанные на молекулярно-генетических данных [26]. Универсальной системой идентификации по генетической информации является анализ нуклеотидной последовательности 16S-рРНК гена. Метод начал развиваться в 1980-х годах когда С. Woese с сотрудниками, установили что, филогенетические отношения бактерий могут быть определены, сравнивая высоко консервативную часть генетического кода [27].

Для идентификации используют и другие гены: Ген 18S-рРНК [28]; Область внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) между 16S рРНК и 23S рРНК. ITS-регион является полиморфным в нуклеотидных последовательностях, как правило, содержит гены транспортной РНК; Белок-кодирующие гены и т.д. [29].

В тех исследованиях, которые основаны на мультигенном анализе, точность и надежность филогенетического выхода возрастает, поскольку есть возможность проанализировать больше генетической информации. Тем не менее, этот вид анализа имеет свои недостатки, поскольку он требует проведения большего числа дорогостоящих молекулярно-генетических анализов, в частности, ПЦР и секвенирования, чем при использовании одного генетического маркера. Преимущества гена 16S-рРНК среди всех остальных

маркёров заключается в его успешном применении в любом молекулярно-генетическом исследовании [29].

### **1.5 Ген 16S-рибосомальной РНК**

Для характеристик состава микробных сообществ используются как традиционные микробиологические методы, предполагающие получение чистых культур микроорганизмов и их характеристику, так и молекулярные методы идентификации микроорганизмов по последовательностям маркерных генов, без их культивирования [30, 31].

Как уже говорилось ранее, самым распространенным маркерным геном бактерий является ген 16S рибосомальной РНК (16S-рРНК). Ген 16S-рРНК находится в малой субъединице рибосом прокариот (30S). Он несет как консервативные, так и переменные участки нуклеотидной последовательности, что позволяет использовать его как для определения рода, так и видовой идентификации микроорганизмов. Консервативные участки идентичны у всех микроорганизмов и используются для отжига праймеров при ПЦР, а переменные или видоспецифичные участки используются для идентификации микроорганизмов [32, 33].

Ген рРНК малой субъединицы рибосомы важен для оценки эволюционных отношений между бактериями, поскольку он эволюционирует медленно и его продукт жизненно важен и функционально консервативен. Внутри одного вида сходство гена 16S-рРНК достигает 98–99%.

Последовательности гена 16S-рРНК известны для большого количества бактерий и представлены в свободном доступе в генетических базах данных, таких как GenBank. Это позволяет сравнивать полученные последовательности с уже имеющимися, и тем самым идентифицировать микроорганизмы [34].

## 1.6 Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция – метод молекулярной биологии, который позволяет добиться значительного увеличения копий определенного фрагмента ДНК в биологическом материале. Метод был изобретен американским биохимиком Кэрри Маллисом в 1983 году [35].

Метод ПЦР широко используется во всех областях биологии и медицины: молекулярной диагностике (детекции микроорганизмов и вирусов, анализе экспрессии генов, выявлении индивидуальных генетических особенностей), а также в молекулярном клонировании, секвенировании и в других молекулярно-генетических исследованиях [35, 36].

ПЦР - искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфической последовательности ДНК, осуществляемый *in vitro*. Копирование ДНК при ПЦР осуществляется специальным ферментом – ДНК-полимеразой, как и в клетках живых организмов. ДНК-полимераза, двигаясь по одиночной цепи ДНК (матрице), синтезирует комплементарную ей последовательность ДНК. Важно, что ДНК-полимераза не может начать синтез цепи ДНК «с нуля», ей необходима короткая «затравочная» цепь – олигонуклеотидный праймер, к которой она может начать присоединять нуклеотиды. Специфичность ПЦР определяется способностью праймеров «узнавать» строго определенный участок ДНК и связываться с ним согласно принципу молекулярной комплементарности [37].

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1 °С. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», и последующего хранения амплифицированных молекул при 4 °С. Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшет, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера (затравки, необходимые для инициации синтеза ДНК), комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие [38, 39].
- Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.
- Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется

Вся технология ПЦР состоит из трех стадий:

- Стадия I – подготовка матрицы, которая включает выделение и очистку ДНК или РНК, определение их концентрации, оценку качества матрицы, синтез комплементарной ДНК (кДНК) (в том случае, когда в качестве исходной матрицы выступает РНК), концентрирование (при необходимости повышения чувствительности детекции);
- Стадия II – амплификация или собственно ПЦР;
- Стадия III – разделение и визуализация (детекция) продуктов реакции с помощью аналитического гель-электрофореза или иных инструментальных методов разделения и детекции нуклеиновых кислот.

Собственно ПЦР состоит из многократно повторяющихся циклов (как правило, 25-35) амплификации, каждый из которых включает три этапа (раунда): денатурация (расплетение, плавление) двухцепочечных фрагментов ДНК, “отжиг” (присоединение, гибридизация) праймеров к матрице и полимеризация (удлинение праймеров, элонгация).

Первый этап предусматривает нагрев реакционной смеси до температуры, при которой большинство двухцепочечных фрагментов ДНК будут денатурированы и ДНК распадется на отдельные цепи. При этом температура и продолжительность температурной обработки реакционной смеси подбираются так, чтобы основная часть молекул ДНК-полимеразы осталась в не активированном состоянии (обычно от +93°C до +96°C, 30-120сек.).

На втором этапе каждого цикла ПЦР реакционная смесь охлаждается до температуры, оптимальной для комплементарного спаривания праймеров со специфическим участком одноцепочечной ДНК-матрицы (обычно от +37°C до +65°C). Праймеры – это короткие (как правило, 18-30 нуклеотидов) химически синтезированные олигонуклеотиды, являющиеся затравками (инициаторами) синтеза цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание цепи происходит только между ними. Места (сайты) посадки праймеров на ДНК-матрице и определяют размер того участка ДНК, который будет амплифицирован.

Наконец, на третьем этапе происходит синтез комплементарных цепей ДНК, который инициируется праймерами, идет в направлении 5'→3' и катализируется ДНК-полимеразой. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, добавляемые в реакционную смесь. Продолжительность этапа амплификации составляет, в среднем, 20-40сек. и определяется скоростью работы полимеразы и размером того фрагмента ДНК, который нужно синтезировать (обычно от нескольких сотен до 5-6тыс. нуклеотидов) [40] .



## 1.7 Рестрикция ДНК

Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы — группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных ДНК в большинстве прокариотических (бактерии и сине-зеленые водоросли) и некоторых других организмах и выполняющие тем самым "иммунную" функцию – системы рестрикции-модификации [41, 42].

Это ферменты, «узнающие» определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК. Их выделяют преимущественно из прокариотических клеток [43].

В отличие от экзонуклеаз, рестриктазы эндонуклеазы расщепляют нуклеиновые кислоты не с конца молекулы, а в середине. При этом каждая рестриктаза узнаёт определённый участок ДНК длиной от четырёх пар нуклеотидов и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне него.

К 2007 году было выделено более трех тысяч эндонуклеаз рестрикции. Более тысячи рестриктаз доступны в виде коммерческих препаратов и повседневно используются в лабораториях для модификации ДНК и решения генно-инженерных задач [43].

Различают 3 основных класса рестриктаз:

Рестриктазы первого типа (например, EcoR из *Escherichia coli* K12) узнают определённую последовательность нуклеотидов и разрезают двухцепочную молекулу ДНК неподалёку от этой последовательности в произвольной точке и само место разреза не строго специально [44].

Рестриктазы второго типа (например, EcoRI) узнают определённую последовательность и разрезают двойную спираль ДНК в определённой фиксированной точке внутри этой последовательности. Рестриктазы этого типа узнают палиндромальные последовательности, которые обладают центральной осью и считываются одинаково в обе стороны от оси симметрии.

Рестриктазы третьего промежуточного типа (например, EcoPI) узнают нужную последовательность и разрезают двухцепочную молекулу ДНК, отступив определённое число нуклеотидных пар от её конца (или в нескольких точках на разном удалении от сайта узнавания). При этом образуются фрагменты ДНК либо с ровными (тупыми) концами, либо с выступающими (липкими) 5'- или 3'-концами. Эти рестриктазы узнают асимметричные сайты. [44]

Также рестриктазы делят на мелко- и крупнощеплящие. Мелкощеплящие рестриктазы узнают тетрануклеотид и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупнощеплящие, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар. К мелкощеплящим относятся рестриктазы Hpa II и Alu (из *Arthrobacter luteus*), к крупнощеплящим - Eco R I (из *Escherichia coli*) и Hind III [45].

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 лишь незначительны.

Рестрикционный анализ ДНК широко используется в молекулярно-биологических исследованиях и прикладных работах и является одним из наиболее важных инструментов при изучении ДНК. При помощи эндонуклеаз рестрикции можно исследовать ДНК различных вирусов, бактерий, животных, растений [46, 47, 48, 49].

Как правило, продукты расщепления ДНК анализируются с помощью гель-электрофореза в агарозном или акриламидном геле, а полученная таким образом картина разделения фрагментов ДНК в виде определенного, отличающегося для разных ферментов, набора полос и является результатом рестрикционного анализа той или иной ДНК [50].

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

При использовании нескольких эндонуклеаз рестрикции на одном образце можно составлять рестриционные карты. Располагая такой информацией, можно идентифицировать на ДНК биологически важные участки. Поскольку рестриционная карта отражает расположение определенной последовательности нуклеотидов в данном участке, сравнение таких карт для двух или более родственных генов позволяет оценить гомологию между ними. Анализируя рестриционные карты, можно сравнивать определенные участки ДНК разных видов животных без определения их нуклеотидной последовательности. Таким образом, например, было установлено, что хромосомные участки, кодирующие цепи гемоглобина у человека, орангутанга и шимпанзе сохранились в практически неизменном виде в течение последних 5 - 10 млн. лет [50].

Метод рестриционного картирования позволяет увидеть крупные генетические изменения, такие как делеции или инсерции. При этом происходит уменьшение или увеличение рестриционных фрагментов, а также исчезновение или возникновение сайтов рестрикции.

## 1.8 Электрофорез ДНК

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. 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 [51].

В начале 70-х годов было показано, что с помощью гель-электрофореза можно определить длину и чистоту молекул ДНК, а также разделить и выделить нужные фрагменты. Этот метод прост, так как каждый нуклеотид в молекуле нуклеиновой кислоты обладает отрицательным зарядом, который движется к положительному электроду. Чтобы разделить молекулы ДНК, исходя из их размера, электрофорез проводят в гелях. Были разработаны специальные гели, с помощью которых удается разделить фрагменты ДНК длиной до 500 нуклеотидов, отличающиеся всего лишь на несколько нуклеотидов: полиакриламидные, агарозные. Поскольку поры в полиакриламидном геле для больших молекул ДНК слишком малы, то для разделения молекул ДНК по размеру были разработаны специальные гели на основе агарозы (полисахарида, выделяемого из морских водорослей). Оба эти метода разделения ДНК (в полиакриламидном геле и агарозном геле) широко используются для аналитических и препаративных целей. [51].

Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами, например центрифугированием в градиенте плотности [51].

Агарозный гель-электрофорез используется для разделения молекул ДНК по размеру, определения размера фрагментов ДНК с помощью маркеров. Электрофорез позволяет определения примерное количество ДНК по яркости свечения полос ДНК в ультрафиолетовом свете благодаря окрашиванию геля бромистым этидием. Просматривая покрашенный гель в ультрафиолетовом свете, можно заметить даже 1 нг ДНК.

Разделение фрагментов ДНК происходит из-за наличия у них заряда. Фосфатные остатки у нуклеотидов имеют отрицательный заряд, благодаря чему ДНК движется под действием электрического тока от анода к катоду. Напряженность электрического поля при разделении в агарозных гелях составляет 1 – 8 В/см [52, 53].

Компоненты электрофореза в агарозном геле:

**Агароза.** Агароза, природный коллоид, который выделяют из морских водорослей, является линейным полисахаридом (средняя молекулярная масса ~12 000 Да. Агароза очень хрупка, и легко разрушается при манипулировании. Агарозные гели имеют «поры» большого размера и используются преимущественно для разделения больших молекул с молекулярной массой большей, чем 200 кДа.

Разделение в агарозных гелях происходит быстро, но с ограниченным разрешением, так как полосы, образующиеся в агарозных гелях, имеют тенденцию размываться/диффундировать и распространяться в стороны. Это является результатом большого размера пор и не может быть предотвращено. Агарозные гели получают суспендированием сухого порошка агарозы в водном буфере, и кипячением смеси до того момента, когда агароза расплавится и образует прозрачный раствор. Затем раствор наливают на подложку и дают остыть до комнатной температуры, чтобы сформировался прочный гель. При застывании агароза формирует матрикс, плотность которого определяется концентрацией.

Фрагмент ДНК заданного размера перемещается в геле на различные расстояния в зависимости от концентрации агарозы. При соответствующих

концентрациях агарозы и/или буфера возможно разделить сегменты ДНК, содержащие от 20 до 50000 н.п. (нуклеотидных пар).

Обычно используется агарозные гели с концентрацией агарозы от 0.7% до 3%

**Буфер для электрофореза.** На электрофоретическую подвижность ДНК воздействуют состав и ионная сила буфера для электрофореза. В буфере с высокой ионной силой электропроводность очень эффективна, и образуется значительное количество тепла. В худшем случае, гель расплавляется и ДНК денатурирует.

Существует несколько буферов для электрофореза нативной двухцепочечной ДНК. Они содержат EDTA (pH 8.0) и Tris-ацетат (TAE), Tris-борат (TBE), или Tris-фосфат (TPE) в концентрации приблизительно 50 mM (pH 7.5 - 7.8). Буферы для электрофореза обычно готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре.

**ДНК маркеры.** При заданном напряжении, концентрации агарозного геля и буфера, расстояние перемещения зависит от молекулярного веса исходного материала. Поэтому, маркерная ДНК известного размера должна наноситься на дорожки и с левого, и с правого края геля. Маркер обычно содержит определенный набор известных сегментов ДНК, которые облегчают определение размера исследуемой ДНК, если какое либо систематическое искривление геля возникнет во время электрофореза.

**Буфер для нанесения.** Образцы ДНК, которые будут наноситься на агарозный гель, сначала смешивают с буфером для нанесения, обычно содержащим воду, сахарозу и краситель (например ксиленцианол, бромфеноловый синий, бромкрезол зеленый и др.). Максимальное количество ДНК, которое может быть нанесено, зависит от числа фрагментов. Минимальное количество ДНК, которое может быть выявлено на снимках геля, окрашенного бромистым этидием, составляет около 2 нг в полосе, шириной 0.5 см. Если в полосе такой ширины находится более 500 нг ДНК, значит дорожка перегружена, что приводит к размыванию полосы.

Буфер для нанесения используется для трех целей:

- Увеличение плотности образца для обеспечения попадания ДНК в лунку
- Добавления красителя к образцу, чтобы облегчить процесс нанесения
- Добавление к образцу такого красителя, который в электрическом поле будет двигаться в сторону анода на предсказуемое расстояние [54].

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

**Размер молекул ДНК.** Чем больше молекула ДНК, тем медленнее она перемещается в геле

**Концентрация агарозы.** Фрагменты ДНК перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными скоростями. Таким образом, применяя гели разных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру.

**Конформация ДНК.** ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например кольцевая неповрежденная (форма I), кольцевая с одноцепочечным разрывом (форма II) и линейная (форма III), движутся в агарозном геле с разными скоростями. Чаще всего линейная форма (форма III) мигрирует медленнее всех.

**Напряженность электрического поля.** При низких напряженностях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Однако с увеличением напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает. Следовательно, с увеличением напряженности область эффективного разделения ДНК в агарозном геле снижается. Максимальное разделение фрагментов происходит при напряженности, не превышающей 5 В/см. При большом напряжении и малой концентрации агарозы может возникнуть краевой эффект, когда крайние дорожки начнут изгибаться. При таком эффекте общий электрофоретический профиль выглядит как выпуклая линза [55].

**Температура.** В агарозных гелях в области температур от 4 до 30°C изменения относительной электрофоретической подвижности фрагментов ДНК

разного размера не наблюдается. Обычно электрофорез в агарозных гелях ведут при комнатной температуре [56].

Наиболее удобный метод визуализации ДНК в агарозных гелях – окрашивание ее флуоресцирующим красителем бромистым этидием. Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. В результате такой интеркаляции в непосредственной близости от оснований краситель связывается с ДНК, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции. УФ-излучение, поглощаемое ДНК в области 260 нм и передаваемое на краситель (или же излучение, поглощаемое самим красителем при длинах волн 302 и 366 нм), испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм). Обычно раствор бромистого этидия добавляют и в гель, и в электрофоретический буфер. В его присутствии электрофоретическая подвижность линейной двухцепочечной ДНК снижается примерно на 15%, но зато при этом появляется возможность наблюдать за процессом разделения непосредственно под источником УФ-излучения во время или в конце разделения. Можно также проводить электрофорез в отсутствие бромистого этидия и окрашивать ДНК уже после завершения разделения. В последнем случае гель помещается в электрофорезный буфер или воду, содержащие бромистый этидий, на 30 мин при комнатной температуре. Бромистый этидий является сильным мутагеном. Все манипуляции с гелями и растворами, содержащими краситель, необходимо проводить в перчатках [56].



## 1.9 Полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) — это способ исследования геномной ДНК, путем разрезания ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путем гель-электрофореза [57].

При использовании данного исследования получают различные результаты от различных образцов, и при помощи анализа полиморфизма длин фрагментов рестрикции можно идентифицировать некоторые различия в последовательности нуклеотидов ДНК, в случае, когда они располагаются в сайте рестрикции.

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. Следовательно, любая мутация, изменяющая последовательность нуклеотидов сайта рестрикции, уничтожает этот сайт. Полное расщепление анализируемой геномной ДНК отдельными рестриктазами приводит к образованию определенного набора фрагментов ДНК, число и размеры которых соответствуют расположению сайтов рестрикции. Мутационная изменчивость в сайтах рестрикции может быть легко обнаружена по изменению длины рестрикционных фрагментов ДНК. При наличии мутации в одном из сайтов рестрикции этот сайт остается нерасщепленным после завершения рестрикции, что приводит к слиянию соседних рестрикционных фрагментов ДНК, разделяемых мутантным сайтом, и образованию фрагмента ДНК большего размера. В результате длина рестрикционных фрагментов ДНК, содержащих мутантные сайты, становится полиморфной, что выявляется при сравнении ДНК из разных источников методом ПДРФ [58].

Полиморфизм ДНК в нашем случае это наличие вариабельности в последовательности нуклеотидов в одном и том же гене (выполняющем те же функции) у близкородственных видов. Полиморфизм вызывается несколькими причинами: точечными мутациями в виде единичных нуклеотидных замен, ошибками при репликации ДНК в виде инсерций или делеций протяжённостью от одного до сотен или тысяч нуклеотидов, крупными делециями, вставками, транслокациями, транспозициями мобильных генетических элементов и т. п. Все изменения в первичной структуре ДНК ведут к изменениям в длине фрагментов, образующихся под воздействием рестриктаз.

### **1.10 Секвенирование последовательностей ДНК**

Многие задачи современной биологии, а также медицинские методы диагностики, требуют знания нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК живых организмов. Секвенирование геномов микроорганизмов позволяет получить наиболее полную информацию о генетических особенностях изучаемых бактерий, включая наличие отдельных генов и мобильных генетических элементов, определяющих патогенность изучаемого штамма, и также является одним из методов идентификации микроорганизмов в метагеномных исследованиях [59]. Поэтому возникает необходимость в дешевых и быстрых методиках секвенирования. В настоящее время такие методики разработаны и активно применяются. Все они состоят из снятия информации с физического носителя — молекулы ДНК или РНК, и последующей обработки полученной информации на вычислительной технике.

Секвенирование биополимеров ДНК — определение ее первичной нуклеотидной последовательности. В результате получается линейное символическое описание, которое сжато характеризует структуру молекулы ДНК. Обычно до начала секвенирования производят амплификацию (увеличение числа копий) участка ДНК, последовательность которого требуется определить,

при помощи полимеразной цепной реакции (реакции удвоения ДНК под действием фермента полимеразы).

Существует много типов секвенирования: секвенирование по Сэнджеру, пиросеквенирование ДНК, секвенирование нового поколения, полупроводниковое секвенирование. и др. В данной работе был использован метод секвенирования по Сэнджеру [60].

Секвенирование по Сэнджеру – дидезоксинуклеотидный метод секвенирования ДНК, основанный на случайном обрыве синтезируемой ферментом второй цепи ДНК при включении меченого дидезоксинуклеотида. Дидезоксинуклеотид — это полученный искусственным путем нуклеотид, лишенный 2'- и 3' - гидроксильных групп при углеродных атомах сахарного кольца. У дезоксинуклеотида, входящего в норму в состав ДНК, отсутствует только 2'-гидроксильная группа. Удлинение цепи во время репликации ДНК происходит в результате присоединения очередного нуклеозидтрифосфата к 3'-гидроксильной группе последнего нуклеотида растущей цепи. И если таким очередным присоединяемым звеном является дидезоксинуклеотид, то синтез ДНК останавливается, поскольку следующий нуклеотид не может образовать фосфодиэфирную связь. Остановка синтеза ДНК — это ключевой этап дидезокси-метода [61].

На сегодняшний день, данный метод высоко автоматизирован и проводится с использованием капиллярных секвенаторов. Секвенирование по Сэнджеру дает последовательности очень высокого качества и достаточно длинные (800 - 1500 п.н.) однако требует очень высоких затрат времени, денег и высококвалифицированного труда [62].

## 1.11 Анализ *in silico*

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

С помощью компьютерного моделирования анализируют нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности, производят выравнивание последовательностей, поиск гомологичных последовательностей ДНК, РНК и белков, построение филогенетических карт, используя специальное программное обеспечение. Осуществляют такие манипуляции как: 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.

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 [63].

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

## 1.12 Используемые образцы бактерии

**Фотобактерии** - *Photobacterium phosphoreum*. Грамотрицательные, аэробные бактерии, представляют собой короткие палочки, или коккобациллы, подвижны благодаря наличию одного жгутика или целого пучка полярных жгутиков. Живут в симбиозе с морскими организмами, способны излучать голубовато-зеленый свет (490 нм) за счет химической реакции между флавиномононуклеотидом и молекулярного кислорода с участием фермента - люциферазы. Оптимальная температура роста: 18-25°C . Благодаря способности к биолюминесценции *P. phosphoreum* используется в биотехнологических процессах, например для оценки концентрации НАДН или чтобы определить загрязнение вод [64, 65, 66, 67].

**Кишечная палочка** - *Escherichia coli*. Грамотрицательная бактерия, факультативный анаэроб, не образует эндоспор. Клетки палочковидные, со слегка закруглёнными концами, размером 0,4 - 0,8 до 1 - 3 мкм . Широко встречается в нижней части кишечника теплокровных организмов. Большинство штаммов *E. coli* являются безвредными, однако некоторые могут вызывать тяжёлые пищевые отравления у людей. Безвредные штаммы являются частью нормальной флоры кишечника человека и животных и могут выполнять симбиотические функции. Кишечная палочка может приносить пользу организму хозяина, например, синтезируя витамин К, а также предотвращая развитие патогенных микроорганизмов в кишечнике.

Наличие *E. coli* в окружающей среде является важным индикатором состояния окружающей среды. Эти бактерии легко могут быть выращены в лабораторных условиях, поэтому кишечная палочка играет важную роль в биотехнологии и генетических исследованиях. *E. coli* является одним из самых изученных прокариотических микроорганизмов и одним из самых важных объектов в практической микробиологии [68, 69, 70, 71, 72].

**Водородокисляющая бактерия** - *Ralstonia eutropha* *R. eutropha* является водородокисляющей бактерией, способной к росту на границе анаэробных и

аэробных условиях, может легко адаптироваться между гетеротрофным и автотрофным образом жизни. В качестве источника энергии может использовать органические соединения и водород. *R. eutropha* может использовать аэробное дыхание или анаэробное дыхание. *R. eutropha* производит биопластик полигидроксиалканоат (ПГА) пластмасс при выращивании в избыточном количестве углеводного субстрата. При этом ПГА может накапливаться до уровня примерно 90% от сухого веса клетки. Используемый штамм: B5786 грамотрицательная литоавтотрофная бактерия *Ralstonia eutropha* B 5786, которая использует CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub> в качестве источников углерода и энергии в отсутствие энергетического субстрата [73].

**Бактерии биодеструкторы ПГА.** Среди бактерий способных к деструкции ПГА по российским и англоязычным источникам относят множество почвенных бактерий, а также бактерий обитающих в водной среде. Основными деструкторами ПГА: являются бактерии родов *Comamonas*, *Leptothrix*, *Acidovorax*, *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Mycobacterium*, *Enterobacter*, *Bacillus* и *Gracilibacillus*. Среди представителей данных родов бактерий есть как грамм-отрицательные так и грамм-положительные бактерии, все они отличаются разнообразием форм и размеров [74, 75, 76, 77].

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объекты исследования

Исследуемые образцы бактерий био-деструкторов ПГА были предоставлены А. А. Косоговой с кафедры биотехнологии СФУ. А. А. Косоговой были выявлены 15 образцов, способных к биодеструкции ПГА, которые в последующем были систематизированы по совокупности морфологических, культуральных, биохимических признаков.

Образцы водородоокисляющих бактерий - *Ralstonia eutropha* В 5786 были получены из музея лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза ИБФ СО РАН.

Образцы бактерий кишечной палочки - *Escherichia coli* К-12 были предоставлены Т. Л. Козловой с кафедры биотехнологии СФУ.

Образцы фотобактерий - *Photobacterium phosphoreum* 1883 IBSO были получены из музея лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН.

Образцы бактерий *Ralstonia eutropha*, *Escherichia coli* К-12 и *Photobacterium phosphoreum* 1883 IBSO использовался в работе в качестве маркеров для более точного определения длин фрагментов рестрикции исследуемых образцов.

### 2.2 Методика выделения ДНК

Выделение бактериальной геномной ДНК при помощи набора AxuPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit и входящей в состав набора инструкцией. Методика выделения основана на эффективном выходе геномной ДНК посредством специального лизисного буфера GA (лизисный буфер). После этого быстрое отделение геномной ДНК от протеинов, полисахаридов и липидов достигается уникальным фазоразделительным шагом при добавлении буфера DV. Высокоочищенная геномная ДНК находится в нижней фазе. Затем

нижнюю фазу с растворённой в ней ДНК наносят на фильтр и центрифугируют. На фильтре оседают оставшиеся белки, липиды и полисахариды, а также клеточные стенки бактерий. Следующим шагом раствор ДНК наносят на колонку, где ДНК связывается с ней благодаря буферу BV (ДНК связывающий буфер). 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 элюентом (2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5.) буфером [78].

Концентрацию и чистоту полученной ДНК измеряли на спектрофотометре Bio-Rad SmartSpec™ Plus spectrophotometer.

## 2.2 Проведение полимеразной цепной реакции

При постановки реакции ПЦР для 15 проб. Объем реакционной смеси 50 мкл. Сначала была приготовлена смесь с запасом на 16 образцов. Смесь готовили на ледяной подставке.

Для получения ампликонов ограниченных последовательностями праймеров:

500 L – 5'-CGTGCCAGCAGCCGCGGТАА-3'

1350 R – 5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3'

- 432 мкл H<sub>2</sub>O<sub>(дист)</sub>
- 80 мкл буфера
- 80 мкл dNTP
- 48 мкл + 48 мкл праймеров (конц. 1 мкМ)
- 48 мкл MgCl<sub>2</sub> (конц. 2,5mM )

Все компоненты смеси были смешаны в 1 пробирке. В отдельные 15 пробирок добавили по 46 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемой ДНК бактерий.



После горячего старта, на втором шаге, добавили по 2 мкл фермента ДНК-полимеразы.

Программа ПЦР:

1. 95°C – 2 мин;
2. 80°C – 2 мин;
3. 95°C – 0:10 сек;
4. 64°C – 0:15 сек;
5. 72°C - 1:00 мин;
6. GO TO 3 35 times;
7. 72°C – 4:00;
8. 4°C – 18:00:00ч;
9. END

Далее продукты амплификации подверглись электрофорезу.

Для получения ампликонов ограниченных последовательностями праймеров:

8F – 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1492R – 5'- GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

- 432 мкл H<sub>2</sub>O<sub>(дист)</sub>
- 80 мкл буфера
- 80 мкл dNTP
- 48 мкл + 48 мкл праймеров (конц. 1 μM)
- 48 мкл MgCl<sub>2</sub> (конц. 2,5mM )

Все компоненты смеси были смешаны в 1 пробирке. В отдельные 15 пробирок добавили по 46 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемой ДНК бактерий.

После горячего старта добавили по 2 мкл фермента ДНК-полимеразы.

Программа ПЦР:

1. 95°C – 2 мин;
2. 80°C – 2 мин;
3. 95°C – 0:15 сек;
4. 62°C – 0:20 сек;

5. 72°C - 2:00 мин;
6. GO TO 3 36 times;
7. 72°C – 6:00;
8. 4°C – 18:00:00ч;
9. END

Далее продукты амплификации подверглись электрофорезу.

В качестве ДНК-полимеразы использовали полимеразу Pfu (Конц: 5000 е.а/мл) фирмы «SibEnzyme». Выделена из штамма E.coli, несущего рекомбинантный ген из *Rugosoccus furiosus*.

Pfu ДНК-полимераза обладает 3`-5` экзонуклеазной корректирующей активностью (proof-reading activity), что позволяет полимеразе вести точный синтез. Pfu ДНК полимеразы формирует продукты ПЦР с тупыми концами. Pfu ДНК-полимераза используется для высокоточной амплификации. Рекомендуется для получения ампликонов с целью последующего клонирования, секвенирования, анализа мутаций.

Амплификацию проводили на приборе Bio-rad - MJ Mini Personal Thermal Cycler

## 2.4 Проведение реакции рестрикции

Реакцию проводили в 50 мкл реакционной смеси. При постановки реакции рестрикции для 15 проб сначала была приготовлена смесь с запасом на 16 образцов для каждой рестриктазы. Смесь готовили на ледяной подставке.

- 448 мкл воды
- 80 мкл SE буфера (для каждой рестриктазы свой буфер)
- 80 мкл BSA<sub>(разб.)</sub>
- 32 мкл фермента рестриктазы

В отдельные 15 пробирок было добавлено по 40 мкл из общей смеси и 10 мкл ДНК ампликонов исследуемых бактерий.

Время реакции рестрикции - 2 часа. Температура для каждой рестриктазы выставлялась разная.

Рестриктию проводили в термостате Eppendorf - ThermoStat plus

Для визуализации результатов рестрикции продукты реакции подвергались электрофорезу в агарозном геле.

В работе использовали рестриктазы фирмы «SibEnzyme»

Рестриктаза	Сайт узнавания	Используемый буфер	Оптимальная температура, °C	Температура инактивации, °C	Концентрация, е.а./мл
Afa I	5'-GT <sup>^</sup> AC-3' 3'-CA <sup>^</sup> TG-5'	SE буфер B	37	80	10000
BspFN I	5'-CG <sup>^</sup> CG-3' 3'-GC <sup>^</sup> GC-5'	SE буфер Y	37	65	5000
Hae III	5'-GG <sup>^</sup> CC-3' 3'-CC <sup>^</sup> GG-5'	SE буфер G	37	80	10000
Hha I	5'-GCG <sup>^</sup> C-3' 3'-C <sup>^</sup> GCG-5'	SE буфер Y	50	80	50000
Hpa II	5'-C <sup>^</sup> CGG-3' 3'-GGC <sup>^</sup> C-5'	SE буфер B	37	65	10000
Mbo I	5'- <sup>^</sup> GATC-3' 3'-CTAG <sup>^</sup> -5'	SE буфер O	65	80	5000
Sse9 I	5'- <sup>^</sup> AATT-3' 3'-TTAA <sup>^</sup> -5'	SE буфер B	55	65	5000
Taq I	5'-T <sup>^</sup> CGA-3' 3'-AGC <sup>^</sup> T-5'	SE буфер Y	65	80	20000

Все использованные рестриктазы имеют тетрануклеотидный сайт узнавания, что позволяет получать от 3 до 7 фрагментов ДНК в результате расщепления продукта амплификации, имеющего длину порядка 900 п.о. и 1500 п.о

## 2.5 Проведение электрофореза

### Реактивы:

- 0,85 г агарозы для получения 1,7% геля
- 50 мл электрофорезного буфера TBE
- ДНК Маркеры
- Буфер для нанесения пробы
- Вода
- Образцы ДНК

Агарозу смешивали с буфером для электрофореза, полученную смесь нагревали и кипятили 1 минуту в СВЧ-печи пока не образовалась равномерная суспензия. Полученную суспензию охлаждали до 60°C. В форму для агарозы заранее была установлена гребенка куда после остывания была залита охлажденная суспензия. Форму с гелем оставляли на 30 минут для застывания. Пока гель застывал необходимые пробы ДНК, и праймеры смешивали в отдельном планшете. После того как гель затвердел, гребенка аккуратно извлекалась и подложку с гелем перемещали в электрофорезную кювету. Необходимо следить за тем, чтобы сторона геля с лунками куда будут вноситься пробы ДНК была со стороны анода. В лунки помещались пробы ДНК и по бокам ДНК Маркеры. После добавления проб гель заливали электрофорезным буфера, так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1-2 мм. Электрофорезную камеру закрывали и присоединяли электроды к источнику напряжения. Напряженность при проведении электрофореза составила 80V в течении 2-х часов. По окончанию разделения подложку с гелем вынимали и помещали в красящий раствор бромистого этидия (1 мкг/мл). После 30 мин. прокрашивания подложку вместе с гелем промывали в дистиллированной воде в течение 2 минут. Далее гель помещали в трансиллюминатор геле-документирующей системы и рассмотрела гель в проходящем ультрафиолетовом свете.

Необходимое оборудование для проведения электрофореза:

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

## **2.6 Методика очистки ДНК ампликонов**

Очистку ампликонов проводила с помощью набора фирмы Isogene Laboratory Diatom™ DNA Clean-Up.

Набор для простого и эффективного выделения ДНК из биологических образцов основан на избирательной сорбции ДНК на поверхности стеклянных шариков в присутствии высокой концентрации хаотропного агента. Процесс сорбции ДНК проводится в объеме, а выделение ДНК - в микропробирке типа эппендорф. Выделенная ДНК используется в молекулярно-биологических реакциях без дополнительной очистки. Набор предназначен для элюции 100 образцов ПЦР продуктов объемом до 100 мкл и содержанием ДНК не более 20 мкг или 50 образцов ДНК объемом 200 мкл и содержанием ДНК не более 40 мкг, или большего объема ПЦР продукта при соблюдении объемных пропорций компонентов набора.

Далее можно сразу приступить к работе с очищенной ДНК или хранить ее в течении длительного времени при -20°C.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ**

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

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Выражаю огромную благодарность всем тем, кто принял участие в подготовке, представлении, публичной защите и обсуждении моей диссертации!

Во-первых, хотелось бы выразить искреннюю признательность и благодарность моему научному руководителю доценту кафедры медицинской биологии, кандидату биологических наук Гусейнову Олегу Аладдиновичу за помощь на всех этапах выполнения диссертации.

Во-вторых, выражаю глубокую признательность рецензенту работы Смирновой Ларисе Степановне, доценту кафедры биотехнологии, кандидату биологических наук за высококвалифицированные и объективные отзывы, которые позволили выявить недостатки и глубже понять значение выполненной мной работы, а также за общую положительную оценку диссертации.

Еще хотелось бы поблагодарить старшего научного сотрудника, кандидата химических наук, Бондаря Александра Анатольевича сотрудника ЦКП "Геномика" СО РАН, Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск за проведения секвенирования исследуемых образцов бактерий.

Также выражаю благодарность Титовой Надежде Митрофановне профессору кафедры медицинской биологии за ценные замечания по содержанию и оформлению магистерской диссертации.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПГА – полигидроксиалканоаты

п.о. - пары оснований

нг. – нанограмм

НАДН - никотинамидадениндинуклеотид

мкл. – микролитр

кДНК – комплементарная ДНК

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ITS – internal transcribed spacer, внутренний транскрибируемый спейсер

dTTP – дезокситимидин трифосфат

dNTP - нуклеозидтрифосфат

dGTP – дезоксигуанозин трифосфат

dCTP – дезоксицитидин трифосфат

dATP – дезоксиаденозин трифосфат



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Горохова, С. С. Основы микробиологии, производственной санитарии и гигиены: Учебное пособие / С. С. Горохова, Н. А. Прокопенко, Н.В. Косолапова. – 4-е изд. стер. – Москва : Академия, 2013 – 64 с.
2. Frajman, B. Phylogenetic relationships of *Atocion* and *Viscaria* (Sileneae, Caryophyllaceae) inferred from chloroplast, nuclear ribosomal, and low-copy gene DNA sequences / B. Frajman, N. Heidari, B. Oxelman // *Taxon*. – 2009. – Vol. 58. – № 3. – p. 811-824
3. Rautenberg, A. Geographic and phylogenetic patterns in *Silene* section *Melandrium* (Caryophyllaceae) as inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences / A. Rautenberg, L. Hathaway, B. Oxelman, H.C. Prentice // *Molecular Phylogenetics and Evolution* – 2010. – Vol.57. – № 3. – p. 978(14)
4. Турова, Т. П. Применение методов геносистематики для решения вопросов таксономии и изучения биоразнообразия прокариот : дис. ...д-ра биол. наук : 03.00.07 / Турова Татьяна Павловна. – Москва, 2009. – 86 с.
5. Encyclopedia Britannica School and Library Subscribers [Электронный ресурс] – режим доступа : <http://global.britannica.com> (дата обращения 3.02.2016)
6. Ewa, R. Compostable Polymer Materials / Ewa Rudnik. – UK : Elsevier, 2008. – p. 211
7. Мамедова, Ф. Т. Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и к процессам её биокаталитической трансформации : дис. ... канд. хим. наук : 03.01.06 / Мамедова Фахрия Тахир кызы. – Москва, 2015. – 176 с.
8. Волова, Т. Г. Разрушаемые микробные полигидроксиалканоаты в качестве технического аналога не разрушаемых полиолефинов / Т. Г. Волова // *Journal of Siberian Federal University. Biology* 2. – 2015. – С. 131-151
9. Лысак, В. В. Л88 Микробиология : учеб. пособие / В. В. Лысак. – Минск : БГУ, 2007. – 000 с. : ил. ISBN 985-485-709-3.

- 
10. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева . — Москва : Изд-во МГУ, 2004. — 448 с.
  11. Прунтова, О. В. Курс лекций по общей микробиологии и основам вирусологии. В 2 ч. Ч. 1 / О. В. Прунтова, О. Н. Сахно, М. А. Мазиров ; Владим. гос. ун-т. - Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та, 2006. - 192 с.
  12. Попова, Н. А. Введение в биологию. учеб. пособие / Н. А. Попова. — Новосибирск : Новосиб. гос. университет. — 2012. — 271 с.
  13. Квитко, К. В. Генетика микроорганизмов : уч. пособие / К. В. Квитко, И. А. Захаров под ред. А.В. Пиневича. — 2-е изд. — Санкт-Петербург : Изд. дом СПб. ун-та, 2012. — 268 с.
  14. Шестаков, С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий / С.В. Шестаков // Экол. генетика. — 2007. — Т. 5. — № 2. — С. 12–24.
  15. Северин, Е. С. Биохимия : Учеб. для вузов / Под ред. Е.С. Северина. — Москва : ГЭОТАР-МЕД, 2003. — 779 с.
  16. Guttman, B. Genetics / B. Guttman, A. Griffiths, D. Suzuki, T. Cullis. — UK : Oneworld Publications, Oxford, 2004. — 256 p.
  17. Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their Constituents IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) Accessed 03 Jan 2006
  18. Ponnuswamy, P. On the conformational stability of oligonucleotide duplexes and tRNA molecules / P. Ponnuswamy, M. Gromiha. // Journal of theoretical biology. — 1994. — V. 169. — Is. 4. — P. 419-432.
  19. Francisco, J. Modern genetics / J. Francisco, A. Ayala John, Jr. Kiger : second edition. — University of California, Davis, 1988. — 290 p.
  20. Pabo, C. Protein-DNA recognition / C. Pabo, R. Sauer // Annual review of biochemistry. — 1984. — Т. 53. — №. 1. — P. 293-321.
  21. Clausen-Schaumann, H. Mechanical stability of single DNA molecules / Hauke Clausen-Schaumann, Matthias Rief, Carolin Tolksdorf, Hermann E. Gaub // Biophys J. — 2000. — V. 78. — Is. 4. — P. 1997–2007.

---

22. Chalikian, T. A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: a characterization by calorimetric and volumetric techniques / T. Chalikian, J. Völker, G. Plum, K. Breslauer // Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. – V. 96. – Is. 14. – P. 7853–8.

23. Тихонович, И. А., Проворов Н. А. Сельскохозяйственная микробиология как основа экологически устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные аспекты / И. А. Тихонович, Н. А. Проворов // С.-х. биология. – 2011. – Т. 3. – С. 3-9.

24. Шейбак, В. М. Микробиом кишечника человека и его влияние на метаболизм / В. М. Шейбак // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2015. – №. 2. – С. 50.

25. Ефимочкина, Н.Р. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 14.02.01 / Ефимочкина Наталья Рамозановна. – Москва, 2010. – С. 28.

26. Куйбагаров, М.А. Генетическая идентификация бактерий коллекционных штаммов на основе проведения анализа нуклеотидной последовательности 16s rRNA гена / М.А. Куйбагаров, А.Б. Шевцов, А.Х.Жумалин, Т.Б. Карибаев, Ж.Ж.Аканова, Е.С. Шевцова // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. – 2013. - №2 (77). – С.14-21.

27. Guttel, R. Lessons from an evolving rRNA:16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective / R. Guttel, N. Larsen, C. Woese // Microbiological review, 1994. – Т 8. – № 1. – P. 10-24.

28. Tanabe, A.S. Comparative study of the validity of three regions of the 18S-rRNA gene for massively parallel sequencing-based monitoring of the planktonic eukaryote community / A.S. Tanabe, S. Nagai, K. Hida, M. Yasuike, A. Fujiwara, Y. Nakamura, Y. Takano, S. Katakura // Molecular Ecology Resources. – 2016. – Vol. 16. – P. 402–414.

- 
29. Ефимова, К.В. Молекулярная идентификация и особенности генетического разнообразия цианобактерий и одноклеточных водорослей акватории японского моря : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.07 / Ефимова Ксения Владимировна. – Владивосток, 2016. – 184 с.
30. Chen, L. Rapid Sanger sequencing of the 16S rRNA gene for identification of some common pathogens / L. Chen, Y. Cai, G. Zhou, X. Shi, J. Su, G. Chen, K. Lin // *PloS one*. – 2014. – Т. 9. – №. 2.
31. Кадников, В. В. Молекулярный анализ микробных сообществ мест залегания углеводов на дне озера Байкал : автореф. дис. кандидата биологических наук : 03.01.03 / Кадников Виталий Валерьевич. – Москва, 2014. – 48 с.
32. Ботина, С. Г. Идентификация промышленных штаммов молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического / С. Г. Ботина // *Генетика*. – 2006. – Том 42. – № 12. – С. 1621-1635.
33. Точилина, А. Г. Индикация и идентификация бактерий рода *Lactobacillus* с использованием полимеразной цепной реакции / Г. А. Точилина // *Микробиология, эпидемиология и иммунобиология*. – 2008. – № 3. – С. 69-73.
34. National Center for Biotechnology Information – [электронный ресурс] : режим доступа <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Дата обращения 15.10.2014).
35. 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.
36. Александров, А. А. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики и оценки эффективности химиотерапии туберкулеза : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / Александров Андрей Александрович. – Москва. – 94 с.
37. Лопухов, Л. В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике / Л. В. Лопухов, М. В. Эйдельштейн //

---

Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Том 2.– № 3. – С. 96 – 106.

38. Патрушев, Л. И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. — Москва : Наука, 2005. – в 2 т. – 276 с.

39. Оберемок, В. В. Методические рекомендации к применению ПЦР-метода / В.В. Оберемок : методические указания. – Симферополь, 2008. – 35 с.

40. Гринев, В. В. Введение в технику полимеразной цепной реакции : метод. пособие к лабораторным занятиям по специальному практикуму для студентов биол. фак. / В. В.Гринев. – Минск : БГУ, 2008. – 48 с.

41. Pingoud, A. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism / A. Pingoud et al. // Cellular and molecular life sciences. – 2005. – Т. 62. – №. 6. – С. 685-707.

42. Чмуж, Е. В. Новая эндонуклеаза рестрикции Bisl из *Bacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G (m5C)> l'NGC-3' / Е. В. Чмуж и др. // Биотехнология. – 2005. – №. 3. – С. 22 – 26.

43. 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) (Дата обращения 5.10.2014)

44. Oller A. R. Ability of DNA and spermidine to affect the activity of restriction endonucleases from several bacterial species / A. R. Oller et al // Biochemistry. – 1991. – V. 30. – Is. 9. – P. 2543-2549.

45. Абрамова, З.И. Введение в генетическую инженерию: Учебное пособие для самостоятельной внеаудиторной работы студентов по курсу «Генная инженерия» / З.И. Абрамова. - Казань: Казанский университет, 2008.- 169 с.

46. Чернухин, В. А. Сравнительный рестрикционный анализ хромосомной днк крысы *in vitro* и *in silico* / и др. В. А. Чернухин, М.А. Абдурашитов, В.Н. Томилов, Д.А. Гончар, С.Х. Дягтярев // Вестник биотехнологии. – 2006. – Т. 2. – №. 3. – С. 39.

- 
47. Белова, Е. Г. Герпесвирусы 6, 7, 8-го типов / Е. Г Белова, Т. К. Кускова // Лечащий врач. – 2006. – Т. 2. – С. 76 – 79.
48. Кравец, А. П. Изменения профиля метилирования ДНК растений пшеницы при хроническом  $\gamma$  облучении семян / А. П. Кравец , Т. А. Мюссе , А. В. Литвинчук , Ш. Остермиллер , Г. С. Венгжен , Д. М. Гродзинский // Цитология и генетика. 2010. – № 5. – С. 18 – 22.
49. 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.
50. Абдурашитов, М. А. Метод рестрикционного анализа геномов млекопитающих *in silico* / М.А. Абдурашитов, В.Н. Томилов, В.А. Чернухин, Д.А. Гончар, С.Х. Дегтярев // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчиннико : Москва, 2006 – Т.2. – № 3 – С. 29 – 39.
51. 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.
52. Лагодич, А. В. Методы анализа нуклеиновых кислот : учеб.-метод. пособие для студентов биол. фак. / А. В. Лагодич, О. В. Лагодич. – Минск : БГУ, 2013. – 47 с
53. Васильева, Л. Г. Выделение плазмидной ДНК и ее анализ методом горизонтального электрофореза в агарозном геле : методическое руководство для школы молодых ученых / Л. Г. Васильева. – Москва : Пушино, 2016. – 6 с.
54. Сомма, М. Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов. Сессия 5. Электрофорез в агарозном геле / М. Сомма, М. Кверчи // Всемирная организация здравоохранения. Европейское бюро. – 13 с.
55. Lucotte, G. Introduction to Molecular Cloning Techniques / G. Lucotte; F. Vaneux // Wiley-Blackwell. – 1993. – p. 41.

- 
56. Шлык-Кернер, О.В. Основы генетической инженерии: лабораторный практикум / О. В. Шлык-Кернер Ижевск : Удмуртский университет, 2012. – 56с.
57. Rasmussen, H. B. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis–valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting / Rasmussen H. B. // InTech, 2012.
58. RFLP Method - Restriction Fragment Length Polymorphism [электронный ресурс] – режим доступа: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/RFLP.html> (Дата обращения 17.10.2014)
59. Гончаров, А.Е. Молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи : Федеральные клинические рекомендации / А.Е. Гончаров, Л.П. Зуева, В.В. Колоджиева, Л.А. Кафтырева, Егорова, С.А. М.А. Макарова : Москва, 2014. – 45 с.
60. Краснов, Я.М. Современные методы секвенирования ДНК (обзор) / Я. М. Краснов, Н. П. Гусева, Н. А. Шарапова, А. В. Черкасов // Микробиология / Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов, 2014 – вып. 2. – с. 73 – 79.
61. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Д. Пастернак – Москва : Мир, 2002. – 589 с.
62. Васильев, Г. В. Геномика / Г. В. Васильев // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2014. - Т.18. - № 1. - с. 158 - 165.
- 63 Пономарева, Н. С. Применение расстояний редактирования при биоинформационном анализе геномов для задач оценки состояния репродуктивной системы / Н. С. Пономарева., Г. Н. Реброва, Е. А. Колина // Фундаментальные исследования. – 2015. – №. 7. – С. 774 – 777.
64. Thompson, F. L. Biodiversity of Vibrios / F. L. Thompson, T. Iida, J. Swings // Microbiol Mol Biol Rev. – 2004. - V. 68. – Is. 3. – p. 403-431.
65. Budsberg, J.A. Isolation and Identification of Photobacterium phosphoreum from an Unexpected Niche / J. A. Budsberg // Applied and Environmental Microbiology. - November, 2003. – V. 69. - Is. 11. – p. 6938-6942.

---

66. Nealson, K. H. Bacterial Bioluminescence: Its Control and Ecological Significance/ K. H. Nealson, J. W. Hastings // *Microbiological Reviews*. - December 2001. – V. 43. – Is. 4. – p. 496-518.

67. Sakaguchi, T. Rapid and onsite BOD sensing system using luminous bacterial cells-immobilized chip / Sakaguchi T // *Biosensors and bioelectronics*. – 2007. – V. 22. – Is. 7. – p.1345-1350.

68. Karger, A. Facts about E. coli: dimensions, as discussed in bacteria: Diversity of structure of bacteria / A. Karger, R. Stock // *BMC Microbiology*. – 2003. – V. 12. – P. 229 – 234.

69. Vogt, R. L. Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef / R. L. Vogt, L. Dippold // *Public Health Rep.* – 2002. - V.120. – Is. 2. – P.174–176.

70. Bentley, R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria / R. Bentley, R. Meganathan // *Microbiol. Rev.* - 1999. - V. 46. – Is. 3. – P. 241–80.

71. Hudault, S. Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection / S. Hudault, J. Guignot, A. L. Servin // *Gut*. – 2001. – V. 49. – Is. 1. – P. 47-55.

72. Thompson, A. I. E. coli Thrives in Beach Sands /A. I. Thompson, A. Andrea // *Live Science*. – 2007. – V. 37. – P. 137.

73. Cramm, R. Genomic View of Energy Metabolism in Ralstonia eutropha H16 / R. Gramm // *J Mol Microbiol Biotechnology*. – 2009. – V. 16. – P. 38–52.

74. Волова Т. Г. Биодegradация полигидроксиалканоатов (ПГА) в восточном море и идентификация ПГА-деградирующих бактерий / Т. Г. Волова и др. // *Микробиология*. – 2011. – Т. 80. – №. 2. – С. 266-274

75. Mergaert, J. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates / J. Mergaert et al. // *FEMS microbiology reviews*. – 1992. – V. 9. – Is. 2-4. – P. 317-321.

76. Jendrossek, D. Microbial degradation of Polyhydroxyalkanoates / D. Jendrossek, R. Handrick // *Annual Review of Microbiology*. – 2002. – V. 56. – Is. 1. – P. 403-432.



---

77. Brandi, H. Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates / H. Brandi et al. // Canadian journal of Microbiology. – 1995. – V. 41. – Is. 13. – P. 143-153.

78. Выделение ДНК [электронный ресурс] – режим доступа : <http://www.bioprotech.com.tw/databank/DataSheet/DNARNAPuri/axyprep%20bacterial%20genogen%20DNA%20miniprep%20kit.pdf> (Дата обращения 23.10.2014)