

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е. И. Шишацкая

« ____ » _____ 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

«Применение метода анализа ПДРФ гена 16S рРНК для
идентификации бактерий рода *Rhizobium*»

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

Выпускник _____ М. А. Малинчик

Красноярск 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Азотфиксирующие бактерии.....	6
1.2 Генетический аппарат бактерий	7
1.3 Ген 16S рРНК.....	9
1.4 Полимеразная цепная реакция	10
1.5 Рестрикция ДНК.....	13
1.6 Электрофорез ДНК.....	17
1.7 Анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов	22
1.8 Анализ <i>in silico</i>	24
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	25
2.1 Объекты исследования	25
2.2 Методика выделения ДНК	25
2.3 Проведение полимеразной цепной реакции	26
2.4 Проведение реакции рестрикции.....	27
2.5 Проведение электрофореза.....	28
2.6 Методика очистки ДНК ампликонов	30
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	31
3.1 Выделение ДНК из образцов бактерий	31
3.2 Получение ампликонов гена 16S рРНК	33
3.3 Проведение реакции рестрикции ампликонов 500L-1350R.....	35
3.4 Проведение анализа <i>in silico</i>	36
3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	42
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	44
ПРИЛОЖЕНИЕ А	49
1. Проведение реакции рестрикции <i>in silico</i>	49

ВВЕДЕНИЕ

Цель работы: Идентифицировать бактерии рода *Rhizobium* среди образцов почвенных бактерий, используя метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена 16S-rРНК.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи:**

1. Выделить из биомассы микроорганизмов ДНК, определить ее концентрацию и качество.
2. Получить ампликоны 500L-1350R гена 16S рРНК и провести реакции рестрикции с полученными ампликонами, чтобы затем с помощью электрофореграммы определить вид исследуемой бактерии.
3. Провести электрофорез полученных продуктов гидролиза ампликонов рестриктазами и задокументировать полученные электрофореграммы.
4. Провести рестрикцию ампликонов 500L-1350R гена 16S-rРНК бактерий рода *Rhizobium in silico* с использованием базы данных Genbank.
5. Сравнить практические и теоретические картины электрофоретического разделения рестриктвов данных ампликонов и сделать вывод по полученным совпадениям о родовой принадлежности исследуемого образца.

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

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Азотфиксирующие бактерии

Азотфиксирующие бактерии (азотфиксаторы) усваивают молекулярный азот (N_2) атмосферы и переводят его в органические соединения. Имеют большое значение в круговороте азота в природе, снабжении растений усвояемыми его формами.

Наиболее распространены в природе свободноживущие бактерии, бактерии, живущие в симбиозе главным образом с высшими растениями, а также ассоциативные формы, накапливающие азот в относительно тесных взаимоотношениях с другими микроорганизмами или с растениями. В процессе азотфиксации молекулярный азот восстанавливается до аммиака, который реагирует с кетокислотами, образуя аминокислоты. Источником энергии для восстановления азота служат процессы дыхания у аэробных бактерий и брожения у анаэробных [3].

К азотфиксирующим бактериям относится свыше 130 родов и видов бактерий, более 100 таксонов синезелёных водорослей (цианобактерий) и другие микроорганизмы. К симбиотическим азотфиксирующим бактериям, распространённым в почвах, относятся клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, живущие в симбиозе главным образом с бобовыми растениями.

Бактерии рода *Rhizobium* - строгие аэробы. Среди них различают активные, малоактивные и неактивные культуры. Критерием активности клубеньковых бактерий служит их способность в симбиозе с бобовым растением фиксировать атмосферный азот и использовать его в виде соединений для корневого питания растений [4].

Внедрившись в ткань корня растения-хозяина, они вызывают усиленное деление его клеток, что приводит к появлению клубеньков. В клубеньках бактерии размножаются, растут, превращаясь в утолщённые, разветвленные

формы — бактериоиды; период образования бактериоидов совпадает с периодом активной азотфиксации бобово-ризобияльного симбиоза. Сосудистая система клубенька обеспечивает связь между бактериями и растением-хозяином: растения снабжают бактерии углеводами и минеральными солями, бактерии отдают растению до 70% ассимилированного ими азота. У большинства бобовых однолетних растений отмирание клубеньков начинается в период цветения растения-хозяина; клубеньки многолетних растений могут функционировать в течение многих лет. После разрушения клубенька клетки бактерий попадают в почву и переходят к существованию за счёт органических веществ подобно другим сапрофитным почвенным организмам [5].

1.2 Генетический аппарат бактерий

Генетический аппарат, или нуклеоид, является аналогом ядра у бактерий. Нуклеоид, состоит замкнутых в кольцо или линейных молекулы ДНК. Структура ДНК представлена антипараллельной двойной правозакрученной спиралью [6].

ДНК прокариот существенно отличается по структурной организации от ДНК эукариот: нуклеоид бактерий не имеет ядерной оболочки, ядрышка и основных белков гистонов (имеются гистоноподобные белки - HU, H-NS, IHF, которые участвуют в компактизации ДНК). Геном компактный, количество некодирующих последовательностей ДНК минимально, в гены не включены интроны (кроме генов 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 иногда используются 2 или 3 рамки считывания одной и той же последовательности ДНК, что повышает кодирующий потенциал генома без увеличения его размера [7]. В клетках бактерий и архей кольцевые или линейные молекулы ДНК

прикреплены к клеточной мембране изнутри. Вся ДНК (и нуклеоидная, и плазмидная) клетки образует геном. Обычно бактериальная клетка содержит одну хромосому, но бывает и несколько. Длина бактериальной ДНК в среднем составляет 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 прокариотические нуклеоиды представляют собой высокоупорядоченную структуру, часть ДНК в этой структуре представлена системой из 20 - 100 независимо суперспирализованных петель. Нуклеоиды большинства прокариот имеют молекулярную массу в пределах 1×10^9 - 3×10^9 дальтон. Соотношение пар оснований А+Т и Г+Ц в молекуле ДНК является постоянным для данного вида организма и служит важным диагностическим признаком [8].

Второй компонент бактериального генома – это плазмиды. Плазмиды – кольцевые ДНК длиной до нескольких тысяч пар оснований. Число их в каждой клетке варьируется [9]. Плазмиды – автономно реплицирующиеся внехромосомные генетические элементы. В отличие от потери клеткой хромосом потеря плазмид не приводит к гибели клетки, т.к. плазмиды не являются обязательным генетическим материалом. Однако многие крупные плазмиды содержат гены, кодирующие важные для клетки функции, которые могут оказаться необходимыми в определенных условиях [10].

Геномы прокариот являются динамичными структурами даже в пределах одного вида. 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 родовую и видовую принадлежность. В категорию вспомогательных генов входят операционные гены, контролирующие разные процессы метаболизма и морфофизиологические

признаки, обеспечивающие приспособленность к определенной экологической нише. Многие из таких генов не обязательно присутствуют во всех штаммах одного вида [11].

1.3 Ген 16S рРНК

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 [12].

Самым распространенным маркерным геном бактерий является ген 16S рибосомальной РНК. Ген 16S рРНК присутствует во всех прокариотах и митохондриях. Этот ген кодирует синтез 16S рРНК, которая находится в малой субъединице рибосом прокариот (30S). Он несет как консервативные, так и переменные участки нуклеотидной последовательности, это и позволяет использовать его для определения как родовой, 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 конкретных микроорганизмов [13, 14].

Последовательности гена 16S-рРНК известны для большого количества прокариот и представлены в свободном доступе в генетических базах данных. Это позволяет сравнивать полученные последовательности с уже имеющимися, и тем самым идентифицировать прокариоты [15].

1.4 Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция – метод молекулярной биологии, который позволяет добиться многократного увеличения копий определенного фрагмента ДНК в биологическом материале. Метод был изобретен американским биохимиком Кэрри Маллисом в 1983 году [16].

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 [17].

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 [18].

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1°C. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», и последующего хранения амплифицированных молекул при 4 °C. Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором.

Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшета, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Для проведения ПЦР необходимы 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), *Puycoccus furiosus* (Pfu-полимераза), *Puycoccus woesei* (Pwo-полимераза) и другие [19, 20].
- Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), служащие материалом для синтеза новых цепей ДНК.
- Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит различные 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, определение концентрации, оценку качества матрицы, концентрирование (при необходимости повышения чувствительности детекции);
- Стадия II – амплификация или собственно ПЦР;
- Стадия III – разделение и визуализация продуктов реакции с помощью аналитического гель-электрофореза или иных инструментальных методов разделения и детекции нуклеиновых кислот.

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

Первый этап предусматривает нагрев реакционной смеси до температуры, при которой фрагменты 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 неактивированном состоянии (обычно от +93°C до +96°C, 30-120сек.).

На втором этапе каждого цикла ПЦР реакционная смесь охлаждается до температуры, оптимальной для комплементарного сцепления праймеров со специфическим участком одноцепочечной ДНК-матрицы (обычно от +47°C до +65°C). Праймеры – это короткие (как правило, 17-33 нуклеотида) химически синтезированные олигодезоксирибонуклеотиды, являющиеся затравками (инициаторами) синтеза цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Праймеры должны быть комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, чтобы достраивание цепи происходило только между ними. Места (сайты) посадки

праймеров на ДНК-матрице и определяют величину того участка ДНК, который должен будет амплифицироваться.

Наконец, на третьем этапе происходит синтез комплементарных цепей ДНК, который инициируется праймерами, он идет в направлении 5'→3' и катализируется ДНК-полимеразой. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, находящиеся в реакционной смеси. 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 5-6 тыс. нуклеотидов) [21].

1.5 Рестрикция ДНК

Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы — группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных ДНК в большинстве прокариотических (бактерии и синезеленые водоросли) организмах и выполняющие тем самым "иммунную" функцию [22, 23].

Это ферменты, «узнающие» определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК. Их выделяют преимущественно из прокариотических клеток [24].

В отличие от экзонуклеаз, 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 больше и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне него.

К 2016 году было выделено более трех с половиной тысяч эндонуклеаз рестрикции. Более тысячи рестриктаз доступны в виде коммерческих препаратов и повседневно используются в лабораториях для модификации ДНК и решения генно-инженерных задач [24].

Различают 3 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 [25].

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. [25].

В основном биотехнологии используют рестриктазы 2-го типа. Ферменты второго типа состоят из двух отдельных белков: рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы. Они нуждаются в ионах магния в качестве кофакторов.

В настоящее время выделено более 500 рестриктаз второго типа, однако среди ферментов, выделенных из различных микроорганизмов, встречаются

такие, которые узнают на ДНК одни и те же последовательности. Такие пары или группы называют изошизомерами. Различают истинную изошизомерию, когда ферменты узнают одну и ту же последовательность нуклеотидов и разрывают ДНК в одних и тех же точках, и ложную, когда ферменты, узнавая один и тот же сайт на ДНК, производят разрывы в разных точках в пределах того же сайта.

Большинство рестриктаз второго типа узнают последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупнощепящие. Мелкощепящие рестриктазы узнают тетрануклеотид и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупнощепящие, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар. Это связано с тем, что вероятность встречаемости определенной последовательности из четырех нуклеотидов гораздо выше, чем последовательности из шести нуклеотидов. Например, в ДНК бактериофага T7, состоящей из 40000 пар оснований, отсутствует последовательность, узнаваемая рестриктазой R1 из *E. coli*.

К мелкощепящим относятся рестриктазы Hpa II и Alu (из *Arthrobacter luteus*), к крупнощепящим - Eco RI (из *Escherichia coli*) и Hind III. Если предположить, что участки узнавания рестриктаз распределены вдоль цепи ДНК случайно, то мишень для ферментов, узнающих последовательность (сайт) из четырех нуклеотидов, должна встречаться в среднем 1 раз через каждые 256 пар оснований, а для ферментов, узнающих шесть нуклеотидов, - через 4096 пар оснований. Если сайт рестрикции окажется внутри гена, то обработка ДНК-рестриктазой приведет к его инаktivации. Вероятность такого события очень велика при обработке мелкощепящими рестриктазами и незначительна при применении крупнощепящих эндонуклеаз. Поэтому с целью получения неповрежденного гена расщепление проводят поочередно несколькими крупнощепящими рестриктазами, либо применяют прием "недорестрикции", т.е. рестриксию проводят в таких условиях, когда происходит расщепление лишь в одном сайте [26].

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 провести изучение ДНК различных вирусов, бактерий, животных, растений [27, 28, 29, 30].

Продукты расщепления ДНК обычно анализируются с помощью геле-электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле, а полученная таким образом картина разделения фрагментов ДНК в виде определенного, отличающегося для разных бактерий, набора полос и является результатом рестрикционного анализа той или иной ДНК [31].

Короткие фрагменты мигрируют намного быстрее, чем длинные. При сравнительно высокой концентрации агарозы большие фрагменты вообще не могут проникнуть в гель. В процессе миграции рестрикционные 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 рестрикционному фрагменту, молекулярную массу которого можно определить, проведя калибровку с помощью ДНК с известными молекулярными массами (маркерами).

При использовании нескольких эндонуклеаз рестрикции для одного образца можно составлять рестрикционные карты. Располагая такой информацией, можно идентифицировать на ДНК биологически важные

участки. Поскольку рестрикционная карта отражает расположение определенной последовательности нуклеотидов в данном участке, сравнение таких карт для двух или более родственных генов позволяет оценить гомологию между ними. Анализируя рестрикционные 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 [31].

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

1.6 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.

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 двигается 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 и агарозные. Поскольку поры в полиакриламидном геле для больших молекул ДНК слишком малы, то для разделения крупных молекул ДНК по размеру были разработаны специальные гели на основе агарозы (полисахарида, выделяемого из морских водорослей). Оба эти метода разделения ДНК широко используются для аналитических и препаративных целей.

Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые невозможно разделить другими способами, к примеру, центрифугированием в градиенте плотности [32].

Агарозный гель используется для разделения молекул ДНК по размеру, определения размера фрагментов ДНК с помощью маркеров (молекул ДНК с известными молекулярными массами). Электрофорез позволяет определить примерное количество ДНК по яркости свечения полос ДНК в ультрафиолетовом свете благодаря окрашиванию геля бромистым этидием. Просматривая прокрашенный 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 [33, 34].

Компоненты электрофореза в агарозном геле:

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, размеры пор которого определяются 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%

Буферы 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. При этом гель может расплавиться, и эксперимент потерпит неудачу.

Существует несколько буферов для электрофореза нативной двухцепочечной ДНК. Они содержат EDTA (pH 8.0) и Tris-ацетат (TAE), Tris-

борат (ТВЕ), или Tris-фосфат (ТРЕ) в концентрации приблизительно 50 мМ (рН 7.5 - 7.8). Буферы для электрофореза обычно готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре, особенно это касается трис-боратного буфера.

ДНК маркеры. При заданных напряжении, концентрации агарозного геля и буфере, расстояние перемещения зависит от молекулярного веса биополимера. 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, наличие которых облегчают задачу определения размера исследуемой ДНК.

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:

- Увеличение плотности образца для обеспечения попадания ДНК на дно лунки
- 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 [35].

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 [36].

Состав оснований и температура. Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях слабо зависит от состава оснований ДНК или температуры геля. 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 [37].

Наиболее удобный метод визуализации ДНК в агарозных гелях – окрашивание флуоресцирующим красителем (бромистым этидием). Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. Интеркаляция — это обратимое включение молекулы или группы между другими молекулами или группами. 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). Часто 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 электрофоретический буфер или воду, содержащие бромистый этидий, на 30 мин при комнатной температуре. Бромистый этидий является мутагеном. Все манипуляции с гелями и растворами, содержащими краситель, необходимо проводить в перчатках [37].

1.7 Анализ 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 путем гель-электрофореза [38].

При использовании данного исследования получаются различные результаты от различных образцов, и поэтому 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 [39].

Под полиморфизмом ДНК подразумевается наличие варибельности в последовательности нуклеотидов в одном и том же гене (выполняющем те же функции) у близкородственных видов. Полиморфизм вызывается точечными мутациями в виде единичных нуклеотидных замен, ошибками при репликации ДНК в виде инсерций или делеций протяжённостью от одного до сотен или тысяч нуклеотидов, 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.

1.8 Анализ *in silico*

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

Таким методом анализируют нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности, используя специальное программное обеспечение, при помощи которого производят: выравнивание последовательностей, поиск гомологичных последовательностей ДНК, РНК и белков, построение филогенетических карт. 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 [40].

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

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Исследуемые образцы микроорганизмов были предоставлены нам магистром базовой кафедры биотехнологии СФУ Ларьковой Анной Николаевной. В работе были использованы 12 образцов почвенных бактерий.

2.2 Методика выделения ДНК

Выделение бактериальной геномной ДНК осуществляли при помощи набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit и входящей в состав набора инструкции. Методика выделения основана на эффективном выходе геномной ДНК посредством специального лизисного буфера GA. После этого быстрое отделение геномной ДНК от протеинов, полисахаридов и липидов достигалось фазоразделительным шагом при добавлении буфера DV. Высокоочищенная геномная ДНК находилась в нижней фазе. Нижнюю фазу с растворённой в ней ДНК наносили на фильтр и центрифугировали. На фильтре оседают оставшиеся белки, липиды и полисахариды, а также клеточные стенки бактерий. Следующим шагом раствор ДНК наносили на колонку, где ДНК связывается с ней благодаря буферу BV (ДНК связывающий буфер). Центрифугировали один раз после добавления промывочного буфера W1 и два раза после добавления буфера W2. Центрифугировали 2 минуты при 12000 оборотах. Это делали для того, чтобы очистить ДНК от нежелательных молекул и солей, которые могли пройти через фильтр. Очищенную бактериальную ДНК элюировали с колонки элюентом (2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5.) буфером [41].

2.3 Проведение полимеразной цепной реакции

При постановке реакции ПЦР для 12 проб сначала была приготовлена смесь с запасом на 16 образцов:

Для получения ампликонов ограниченных последовательностями праймеров:

500 L – 5'-CGTGCCAGCAGCCGCGGТАА-3'

1350 R – 5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3'

- 432 мкл H₂O_(дист)
- 80 мкл 10×буфера
- 80 мкл dNTP (0,5 мМ водного раствора каждого)
- 24 мкл + 24 мкл праймеров (по 2 мМ водного раствора каждого)
- 48 мкл MgCl₂ (50 мМ водного раствора)

Все компоненты смеси были смешаны в 1 пробирке. В отдельные 12 пробирок добавили по 46 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемой ДНК бактерий. Смесь готовили на ледяной подставке.

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

Программа ПЦР:

95°C – 2 мин;

80°C – 2 мин;

95°C – 0:10 сек;

64°C – 0:15 сек;

72°C - 1:00 мин;

GO TO 3 35 times;

72°C – 4:00;

4°C – 18:00:00ч; END

Далее провели электрофорез продуктов амплификации. Электрофорез продуктов амплификации ДНК показал, что реакция ПЦР прошла успешно, были получены копии участка ДНК гена 16S-rРНК длиной около 900 пар оснований.

В качестве ДНК-полимеразы использовали полимеразу Pfu (Конц: 5 ед/мкл) фирмы «SibEnzyme». Выделена из штамма E.coli, несущего рекомбинантный ген из Pyrococcus furiosus.

Pfu ДНК-полимераза обладает 3`-5` экзонуклеазной корректирующей активностью (proof-reading activity). 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 постановке реакции рестрикции для 12 проб сначала была приготовлена смесь с запасом на 16 образцов для каждой рестриктазы. Смесь готовили на ледяной подставке.

- 478 мкл воды
- 80 мкл 10×SE буфера (для каждой рестриктазы свой буфер)
- 80 мкл BSA
- 32 мкл фермента рестриктазы (1000 е.а.)

В отдельные 12 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, для каждой своя.

Рестрикцию проводили в термостате Eppendorf - ThermoStat plus.

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

В работе использовали рестриктазы фирмы «SibEnzyme»:

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.

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 до тех пор, пока не образовалась равномерная суспензия. Полученную суспензию охлаждали примерно 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 маркеры 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. После перемешивания с буфером нанесения в лунки помещались пробы ДНК и по бокам ДНК маркеры. После нанесения проб гель покрывали электрофорезным буфером, так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 3-4 мм. Электрофорезную камеру закрывали и присоединяли электроды к источнику напряжения. Напряженность при проведении электрофореза составила 8 вольт/см, время 2 часа. По окончании разделения подложку с гелем вынимали и помещали в красящий раствор бромистого этидия (1 мкг/мл). После 30 минут окрашивания подложку вместе с гелем промывали в дистиллированной воде в течение 2 минут. Далее гель помещали в трансиллюминатор гель-документирующей системы и документировали гель в проходящем УФ-свете.

Необходимое оборудование для проведения электрофореза:

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

2.6 Методика очистки ДНК ампликонов

Очистку ампликонов проводили 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 проводили в объеме 100 мкл, а выделение ДНК - в микропробирке фирмы Эппендорф (0,2 мл). Выделенную ДНК можно использовать в молекулярно-биологических реакциях без дополнительной очистки. Набор предназначен для очистки 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.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Выделение ДНК из образцов бактерий

Из 12 образцов почвенных бактерий была выделена ДНК, были проанализированы ее концентрация и качество спектрофотометрическим и электрофоретическим методами. (Таблица 1)

Таблица 1 - Концентрация и чистота полученной ДНК

№ Пробы	Концентрация (мкг/мл)	Чистота препарата $A_{260}:A_{280}$
1	41	1,84
2	34	1,92
3	48	1,82
4	36	1,96
5	39	1,94
6	34	1,91
7	45	1,96
8	41	1,95
9	37	1,92
10	36	1,95
11	46	1,96
12	36	1,95

Отношение поглощений $A_{260}:A_{280}$ у образцов входит в оптимальный диапазон от 1,8 до 2,0, следовательно, все они годятся для дальнейших исследований.

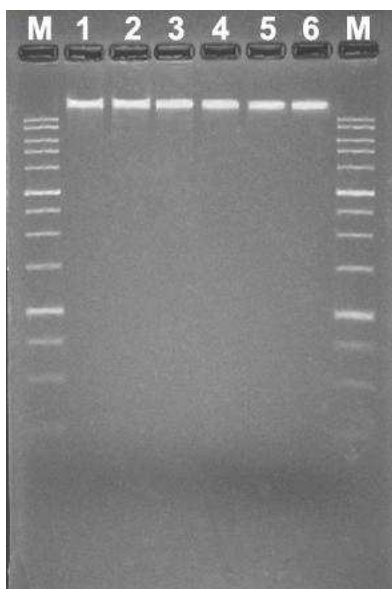


Рисунок 1 – Электрофореграмма ДНК бактерий

М – ДНК маркер 1kb (Сибэнзим)

1 – 6 – Исследуемые образцы бактерий

На рисунке 1 представлен результат электрофореза выделенной ДНК 6 штаммов исследуемых бактерий. Остальные исследуемые образцы показали сходную картину электрофореза. Масса выделенной суммарной ДНК составила более 10 000 п.о.

3.2 Получение ампликонов гена 16S рРНК

С использованием выделенной ДНК были получены ампликоны, которые соответствуют выбранному участку гена 16S рРНК. После амплификации продукты гидролиза были подвергнуты очистке с помощью набора Diatom DNA Clean-Up от праймеров, dNTP и фермента. (Таблица 2)

Таблица 2 - Концентрации и чистота полученных ампликонов

№ Пробы	Концентрация, мкг/мл	Чистота препарата $A_{260}:A_{280}$
1	33	1,93
2	25	1,90
3	31	1,94
4	34	1,92
5	28	1,93
6	27	1,88
7	33	1,91
8	37	1,93
9	29	1,91
10	30	1,90
11	33	1,94
12	35	1,92

Отношение поглощений $A_{260}:A_{280}$ у образцов входит в оптимальный диапазон от 1,8 до 2,0, следовательно все образцы ампликонов были пригодны для дальнейших исследований.

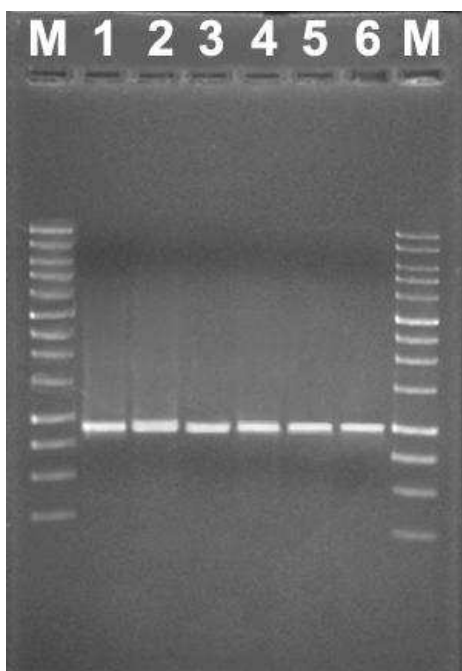


Рисунок 2 – Ампликоны гена 16S рРНК бактерий ограниченные праймерами 500L – 1350R

М – ДНК маркер 1kb (Сибэнзим)

1 – 6 - Исследуемые образцы бактерий

На рисунке 2 представлены результаты электрофореза ампликонов гена 16S рРНК исследуемых бактерий. Остальные образцы показали сходную электрофоретическую картину. Масса ампликонов 500L -1350R составила около 900 п.о. Данная картина электрофоретического распределения позволяет сделать вывод о том, что амплификация была проведена успешно.

3.3 Проведение реакции рестрикции ампликонов 500L-1350R

3.4 Проведение анализа *in silico*

3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных

Таким образом, исходя из сравнения теоретических и практических картин распределения рестриктов, мы сделали вывод о принадлежности к роду

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы была выделена и очищена ДНК высокого качества из образцов почвенных бактерий. Были получены ампликоны гена 16s рРНК размером около 900 п.о. С полученными ампликонами были проведены реакции рестрикции. Данные, полученные в ходе экспериментов, были сверены с результатами анализа *in silico* нуклеотидных последовательностей ДНК из базы данных GenBank. По результатам сравнения построенных электрофореграмм образцы 10 и 11 оказались представителями рода *Rhizobium*.

Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена 16s рРНК может служить достаточно простым способом идентификации микроорганизмов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

кДНК – комплементарная ДНК

п.о. - пары оснований

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бактериальные удобрения на основе клубеньковых бактерий, нитрагин и ризоторфин - [Электронный ресурс] : Режим доступа http://www.biotechnolog.ru/prombt/prombt9_4.htm
2. Rhizobium (бактреии, род) - [электронный ресурс] : режим доступа <http://medbiol.ru/medbiol/botanica/000d4d56.htm>
3. Мишустин, К. Н., Шильникова, В. К.. Биологическая фиксация атмосферного азота / К. Н. Мишустин, В. К. Шильникова - М.: 1968.
4. Стойниер, Р., Эдель берт, Э., Ингрэм, Дж . Мир микробов. пер. с англ.. т. 1-3 / Р. Стойниер, Э. Эдель берт, Дж. Ингрэм. - М.: 1979.
5. Лесная энциклопедия: В 2-х т./Гл.ред. Воробьев Г.И.; Ред.кол.: Анучин Н.А., Атрохин В.Г., Виноградов В.Н. и др. - М.: Сов. энциклопедия, 1985.- 563 с.
6. Лысак, В.В. Л88 Микробиология : учеб. пособие / В. В. Лысак. – Минск : БГУ, 2007. – 000 с. : ил. ISBN 985-485-709-3.
7. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева . — Москва : Изд-во МГУ, 2004. — 448 с.
8. 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 ; В ладим. гос. ун-т. - Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та, 2006. - 192 с.
9. Попова, Н. А. Введение в биологию. учеб. пособие / Н. А. Попова. – Новосибирск : Новосиб. гос. университет. – 2012. – 271 с.
- 10.Квитко, К.В., Захаров И.А. 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.
11. Шестаков, С.В. Как происходит и чем лимитируется гори- зонтальный перенос генов у бактерий / С.В. Шестаков // Экол. генетика. 2007. Т.5, № 2. – С. 12–24.

12. 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. – С. 8.
13. Ботина, С. Г. Идентификация промышленных штаммов молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического / С. Г. Ботина // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 12. – С. 1621-1635.
14. 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.
15. National Center for Biotechnology Information – [электронный ресурс] : режим доступа <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
16. Паренков, А. Д. Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Часть 2. Методы молекулярной диагностики : учебно-методическое пособие / А.Д. Паренков [и др.]. – Нижний Новгород : Нижегородский госуниверситет им. И.Н. Лобачевского, 2015. – 44 с.
17. 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.
18. Лопухов, Л. В. , М. В. Эйдельштейн. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике / Л. В. Лопухов, М. В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т. 2, № 3. – С. 96 – 106.
19. Патрушев, Л. И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. — Москва : Наука, 2005. – Т.2. – 276 с.
20. Оберемок, В.В. Методические рекомендации к применению ПЦР-метода / В.В. Оберемок : методические указания. – Симферополь, 2008. – 35 с.

21. 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.
22. Pingoud A. et al. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism / A. Pingoud et al. // Cellular and molecular life sciences. – 2005. – Т. 62, №. 6. – С. 685-707.
23. Чмуж, Е. В. и др. Новая эндонуклеаза рестрикции BslI из *Bacillus subtilis* ТЗО узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G (m5C)> I'NGC-3' / Е. В. Чмуж и др. // Биотехнология. – 2005. №. 3. – С. 22 – 26.
24. Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз [электронный ресурс] – режим доступа: http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_2.htm
25. Oller, A.R., Vanden Broek W., Conrad M., Topal M.D. Biochemistry, 1991, v. 30, p. 543—549.
26. Slaymaker, I. M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D. A., Yan, W. X., & Zhang, F. (2016). «Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity». *Science* 351 (6268): 84-88.
27. 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.
28. Белова, Е. Г. Герпесвирусы 6, 7, 8-го типов / Е. Г Белова, Т. К. Кускова // Лечащий врач. – 2006. – Т. 2, С. 76 – 79.
29. Кравец, А. П. Изменения профиля метилирования ДНК растений пшеницы при хроническом γ 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Лагодич, А. В. Методы анализа нуклеиновых кислот : учеб.-метод. пособие для студентов биол. фак. / А. В. Лагодич, О. В. Лагодич. – Минск : БГУ, 2013. – с.47
34. Васильева, Л. Г. Выделение плазмидной ДНК и ее анализ методом горизонтального электрофореза в агарозном геле : методическое руководство для школы молодых ученых / Л. Г. Васильева. – М : Пущино, 2016. – 6 с.
35. 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.
36. Lucotte, G. Introduction to Molecular Cloning Techniques / G. Lucotte; F. Vaneux // Wiley-Blackwell. – 1993. – p. 41.
37. Шлык-Кернер, О.В. Основы генетической инженерии: лабораторный практикум / О. В. Шлык-Кернер Ижевск : Удмуртский университет, 2012. – 56с.
38. 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.

39. RFLP Method - Restriction Fragment Length Polymorphism [электронный ресурс] – режим доступа: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/RFLP.html>
40. 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.
41. Выделение ДНК [электронный ресурс] – режим доступа: <http://www.bioprotech.com.tw/databank/DataSheet/DNARNAPuri/ахупреп%20bacterial%20genogen%20DNA%20miniprep%20kit.pdf>
42. pDRAW32 [электронный ресурс] – режим доступа: <http://www.acaclone.com>

ПРИЛОЖЕНИЕ А

1. Проведение реакции рестрикции *in silico*

Для теоретического рестриктирования ампликонов *Rhizobium* были взяты последовательности генов 16S рРНК из базы данных GenBank. Из полной последовательности были выделены ампликоны с использованием известных последовательностей праймеров (8F – agagtttgatcatggctcag и 1492R – aagtcgtaacaaggtagcc). Был проведен рестрикционный анализ *in silico* ампликонов 8F – 1492R и электрофорез с помощью программы pDRAW32. Для рестрикционного анализа были взяты рестриктазы Aat II, Acu I, Alu I, Bfa I, Bst UI, Fat I, Hae III, Hha I, Hpa II, Hpy CH4IV, Mbo I, Mlu CI, Mse I, Rsa I, Sac II, Sma I, Sph I, Tag I, Xho I, Xma I.

New DNA entry, 1446 bp. (LINEAR)
Restriction analysis 06.06.2017
pDRAW32 revision 1.1.132
UNLICENSED
Rebase containing 267 enzymes.
20 enzymes match enzyme selection criteria.

AatII (G_ACGT'C) [ZraI]
Cuts 1 time.
Cuts at position 1131.
Fragment sizes 1131, 315.

AcuI
(CTGAAGnnnnnnnnnnnnnnnn_nn')
[Eco57I]
Cuts 1 time.
Cuts at position 944.
Fragment sizes 944, 502.

AluI (AG'CT) [AluBI]
Cuts 10 times.
Cuts at positions 125, 206, 248, 392,
551, 794, 920, 1005, 1213, 1397.

Fragment sizes 125, 81, 42, 144, 159,
243, 126, 85, 208, 184, 49.

BfaI (C'TA_G) [MaeI,FspBI,XspI]
Cuts 3 times.
Cuts at positions 207, 479, 1280.
Fragment sizes 207, 272, 801, 166.

BstUI (CG'CG)
[AccII,Bsh1236I,BspFNI,BstFNI,
MvnI]
Cuts 5 times.
Cuts at positions 95, 195, 361, 461,
904.
Fragment sizes 95, 100, 166, 100, 443,
542.

FatI ('CATG_)

[NlaIII,CviAII,FaeI,Hin1II,Hsp92II]

Cuts 9 times.

Cuts at positions 10, 46, 354, 880, 990, 1139, 1263, 1297, 1347.

Fragment sizes 10, 36, 308, 526, 110, 149, 124, 34, 50, 99.

HaeIII (GG'CC)

[BshFI,BsnI,BsuRI]

Cuts 8 times.

Cuts at positions 191, 225, 291, 376, 862, 973, 1144, 1323.

Fragment sizes 191, 34, 66, 85, 486, 111, 171, 179, 123.

HhaI (G_CG'C)

[AspLEI,BstHHI,CfoI,Hin6I,HinP1I,

HspAI]

Cuts 6 times.

Cuts at positions 339, 511, 791, 906, 1045, 1379.

Fragment sizes 339, 172, 280, 115, 139, 334, 67.

HpaII (C'CG_G)

[BsiSI,HapII,MspI]

Cuts 6 times.

Cuts at positions 128, 401, 423, 437, 1097, 1319.

Fragment sizes 128, 273, 22, 14, 660, 222, 127.

HpyCH4IV (A'CG_T)

[MaeII,HpySE526I,TaiI]

Cuts 4 times.

Cuts at positions 513, 1128, 1166, 1313.

Fragment sizes 513, 615, 38, 147, 133.

MboI ('GATC_)

[BfuCI,Bsp143I,BssMI,BstKTI,BstM

BI,DpnII,Kzo9I,NdeII,Sau3AI]

[dam methylated]

Cuts 5 times.

Cuts at positions [7], [239], [263], [346], [1291].

Fragment sizes 7, 232, 24, 83, 945, 155.

MluCI ('AATT_) [Sse9I,TasI]

Cuts 6 times.

Cuts at positions 139, 492, 608, 628, 850, 890.

Fragment sizes 139, 353, 116, 20, 222, 40, 556.

MseI (T'TA_A)

[SaqAI,Tru1I,Tru9I]

Cuts 7 times.

Cuts at positions 41, 142, 527, 803, 837, 889, 1027.

Fragment sizes 41, 101, 385, 276, 34, 52, 138, 419.

RsaI (GT'AC)

[AfaI,Csp6I,CviQI,RsaNI]

Cuts 2 times.

Cuts at positions 824, 1329.

Fragment sizes 824, 505, 117.

SacII (CC_GC'GG)

[Cfr42I,KspI,Sfr303I,SgrBI]

Cuts 1 time.

Cuts at position 462.

Fragment sizes 462, 984.

SmaI (CCC'GGG)

[Cfr9I,TspMI,XmaI]

Cuts 1 time.

Cuts at position 1320.

Fragment sizes 1320, 126.

SphI (G_CATG'C) [PaeI]

Cuts 1 time.

Cuts at position 1301.

Fragment sizes 1301, 145.

TaqI (T'CG_A)

[dam methylated]

Cuts 4 times.

Cuts at positions 55, 894, 1209, 1257.

Fragment sizes 55, 839, 315, 48, 189.

XhoI (C'TCGA_G)

[PaeR7I,Sfr274I,SlaI,StrI]

Cuts 1 time.

Cuts at position 1256.

Fragment sizes 1256, 190.

XmaI (C'CCGG_G)

[SmaI,Cfr9I,TspMI]

Cuts 1 time.

Cuts at position 1318.

Fragment sizes 1318, 128.

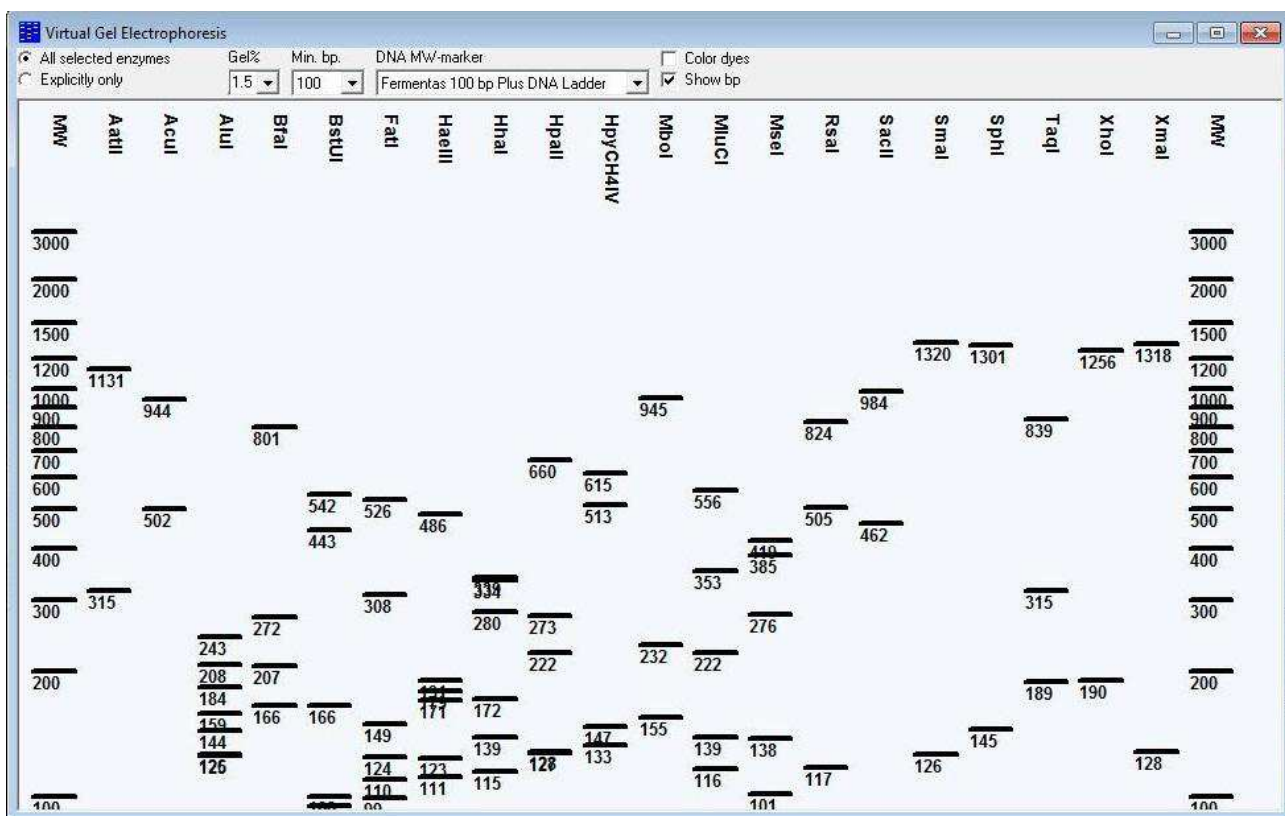



Рисунок 13 – Виртуальные электрофоретические профили рестриктаз для Rhizobium

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Е. И. Шишацкая

« 23 » июня 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

«Применение метода анализа ПДРФ гена 16S рРНК для
идентификации бактерий рода *Rhizobium*»

Научный руководитель



доцент, к.б.н.

О. А. Гусейнов

Выпускник



М. А. Малинчик