

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

«Идентификация бактерий рода *Pseudomonas* методом анализа полиморфизма  
длин рестрикционных фрагментов ампликона 500L-1350R гена 16S рРНК»

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

Выпускник \_\_\_\_\_ Н.С. Евсеенко

Красноярск 2017

# СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Бактерии рода <i>Pseudomonas</i> .....	7
1.2 Традиционные методы идентификации микроорганизмов.....	9
1.3 ДНК.....	12
1.4 Генетическая система бактерий.....	13
1.5 Ген 16S рРНК.....	15
1.6 Выделение ДНК.....	16
1.7 Полимеразная цепная реакция.....	18
1.8 Эндонуклеазы рестрикции.....	22
1.9 Метод анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов.....	24
1.10 Электрофорез ДНК.....	25
1.11 Анализ <i>in silico</i> .....	27
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	29
2.1 Объект исследования.....	29
2.2 Методика выделения ДНК.....	29
2.3 Методика проведение ПЦР.....	29
2.4 Методика проведения реакции рестрикции.....	32
2.5 Методика проведения электрофореза.....	32
3 РЕЗУЛЬТАТЫ.....	34
3.1. Выделение ДНК из образцов бактерий.....	34
3.2. Получение ампликонов гена 16S рРНК.....	36
3.3. Проведение реакции рестрикции ампликонов 500L-1350R.....	37
3.4. Проведение анализа <i>in silico</i> .....	38
3.5. Сравнение экспериментальных и теоретических данных.....	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	48
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	49
4 Список литературы.....	50

## **ВВЕДЕНИЕ**





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

Для достижения заданной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить ДНК из опытных образцов бактерий, определить концентрацию и чистоту полученных препаратов ДНК.
2. Получить ампликоны гена 16S rРНК с использованием пары праймеров 500L и 1350R для данных бактерий.
3. Провести реакции рестрикции для полученных ампликонов.
4. Провести гель-электрофорез полученных рестрикетов с маркерами в агарозном геле и проанализировать полученные электрофореграммы для определения вида исследуемых образцов.
5. Провести рестрикцию ампликонов 500L-1350R гена 16S-rРНК бактерий рода *Pseudomonas in silico* с использованием базы данных Genbank.
6. Сравнить практические и теоретические картины электрофоретического разделения рестрикетов 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 Бактерии рода *Pseudomonas*

Бактерии этого рода широко используются в хозяйственной практике, а также в качестве моделей для многочисленных теоретических исследований.

В 50-60-х годах нашего столетия появилось большое количество научных исследований о бактериях рода *Pseudomonas*, в частности об их флуоресцирующей группе. Эти исследования касаются вопросов использования флуоресцирующих бактерий для решения ряда практических и теоретических задач. Существует много патентов и научно-исследовательских работ американских, японских и советских авторов, где подробно представлены характеристики продуцентов, состав сред для выращивания бактерий и описаны условия культивирования для получения значительных количеств различных биологически активных соединений.

Так, при использовании в качестве продуцентов некоторых штаммов бактерий *Pseudomonas fluorescens* осуществляется биосинтез органических кислот: глюконовой, 2-кетоглюконовой,  $\alpha$ -кетоглутаровой и пировиноградной

Из окрашенных веществ, синтезируемых бактериями рода *Pseudomonas*, были выделены химические вещества, обладающие антибиотическими свойствами, — пиоцианин, хлорорафин, оксихлорорафин, феназин-1-карбоновая кислота и эругинозин. Все перечисленные пигменты обладают антибиотической активностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и грибов.

Кроме антибиотиков, в состав окрашенных веществ, синтезируемых псевдомонадами, входят витамины.

В работах советских и зарубежных исследователей последнего десятилетия отмечается, что флуоресцирующие псевдомонады могут быть продуцентами ферментов. Так, советские исследователи изучают процесс синтеза фермента аспарагиназы, используя *Pseudomonas fluorescens*[4].

Бактерии рода *Pseudomonas* широко распространены в природе. Их можно встретить в воздухе, почве, морских и пресных водоемах, сточных водах и иле, нефти и на газовых месторождениях. Псевдомонады были обнаружены на пищевых продуктах, телах животных, растениях, а также в гнойных ранах и экскрементах больных млекопитающих.

Бактерии рода *Pseudomonas* монолитны по морфологическим и очень разнообразны по культуральным и физиологическим признакам.

Клетки псевдомонад представляют собой мелкие одиночные грамотрицательные палочки. Спор и выростов не образуют, подвижны, имеют полярно расположенные жгутики. Число жгутиков у разных видов колеблется. Клетки в культурах часто объединяются в небольшие комочки или зерна, окруженные толстой слизистой оболочкой, иногда резко очерченной, — зооглеи.

Колонии бактерий очень разнообразны: слизистые и пастообразные, выпуклые и плоские, крупные и мелкие. У многих видов отмечается внутренняя структура колоний. Если их рассматривать в микроскопе при малом увеличении, то в одних случаях можно обнаружить мелкозернистую колонию; в других — ячеистую, напоминающую соты; в третьих — колонии в виде мелких комочков или зерен.

Большинство видов имеет колонии без внутренней структуры — под микроскопом они выглядят как однородная гомогенная масса. Псевдомонады хорошо растут на обычных питательных средах — сложных органических.

Культуры различаются между собой способностью разлагать белки, использовать углеводов, расщеплять крахмал, клетчатку, углеводороды, соединения ароматического ряда и другие сложные по составу вещества.

Большинство бактерий рода *Pseudomonas* обладает гетеротрофным типом обмена веществ, т. е. для построения тела им требуется готовое органическое вещество. Биосинтетические процессы при этом осуществляются за счет обмена окислительного типа, где кислород является конечным акцептором электронов, перенос которых связан с системой цитохромов. Некоторые



представители этого рода могут существовать за счет анаэробного нитратного дыхания, другие используют энергию окисления водорода. Многие виды псевдомонад образуют пигменты, различные по окраске и химической природе; некоторые синтезируют витамины, антибиотики, токсины.

Среди представителей бактерий рода *Pseudomonas* есть формы, токсичные для животных организмов (патогенные бактерии). Имеется также немало фитопатогенных видов, поражающих растения[5].

## **1.2 Традиционные методы идентификации микроорганизмов**

Диагностическая микробиология направлена на выявление и идентификацию известных микроорганизмов из окружающей среды. Идентификация бактерий осуществляется с помощью генетических и морфологических методов, до 80-х годов прошлого века преобладало определение фенотипических характеристик [6].

Идентификация микроорганизмов – это определение видовой или родовой принадлежности на основании изучения биохимических, культурально-морфологических, патогенных, серологических и генетических свойств определенного образца.

Культуральные свойства микроорганизмов определяют при помощи посева на жидкие, полужидкие и плотные среды. На жидких средах учитывают степень и характер помутнения среды; величину, форму и консистенцию осадка; наличие или отсутствие плёнки на поверхности; а также смотрят на размер и форму пристеночного кольца. На полужидких средах определяют рост по уколу, на плотных — форму, размер, величину, цвет колоний и густоту роста. На форму, размер, величину, цвет колоний и густоту роста колоний оказывает большое влияние состав питательной среды, и видовая специфичность микроорганизмов.

Морфологию изучают путём микроскопии мазков патологического материала или исследованием посаженных и окрашенных культур. Обычно

обращают внимание на размер, форму (кокки, палочки или извитые), расположение (одиночно, цепочками, попарно, гроздьями), наличие спор и капсул, включений и жгутиков. Определяют подвижность (исследование культур в висячей капле или посев на полужидкую среду) [7].

Биохимическую активность и метаболизм микроорганизмов изучают на дифференциально-диагностических средах. Определяют способность бактерий расщеплять белки, жиры и углеводы; редуцировать органические краски; восстанавливать нитраты в нитриты и нитриты в аммиак; выделять ферменты.

Серологический метод включает исследования сыворотки крови, а также других биологических субстратов для выявления специфических антител и антигенов. Классическая серодиагностика основана на определении антител к выявленному или предполагаемому возбудителю. Положительный результат реакции свидетельствует о наличии в исследуемой сыворотке крови антител к антигенам возбудителя, отрицательный результат указывает на их отсутствие. Обнаружение в исследуемой сыворотке крови антител к возбудителю ряда инфекционных болезней недостаточно для постановки диагноза, поскольку оно может отражать наличие постинфекционного процесса, поэтому исследуют «парные» сыворотки крови, первую, взятую в первые дни болезни, и вторую, взятую с интервалом 7—10 дней. В этом случае оценивают динамику нарастания уровня антител. Однако, нужно учитывать вероятность того, что разные родственные бактерии могут агглютинироваться одной и той же диагностической сывороткой, что может затруднить их идентификацию.

Патогенность исследуемых микроорганизмов изучают заражением лабораторных животных.

На основании полученных данных, используя определители микроорганизмов, устанавливают принадлежность микроорганизма к определённому семейству, роду и виду [8].

Традиционный метод бактериологического анализа включает три основных этапа:

1—Посев исследуемого материала на чашки с дифференциально-диагностическими средами;

2—Снятие отдельных колоний и накопление чистой культуры с первичной дифференциацией на комбинированных питательных средах;

3—Полная идентификация выделенной культуры по комплексу биохимических признаков, антигенной структуре, патогенности, устойчивости к специфическим бактериофагам и антибиотикам.

Время проведения микробиологического анализа обычно составляет от 72 часов до 4-5 суток. Такие сроки не удовлетворяют эпидемиологов. Особенно в виду появления новых, очень опасных заболеваний, таких как, например, лихорадка Эбола [9].

При использовании традиционных методов:

- требуется много времени на идентификацию микроорганизмов;
- затрачиваются значительные материальные ресурсы;
- не определяются некультивируемые бактерии.

Поэтому существует необходимость использовать более современные и быстрые способы диагностики. В качестве эффективного метода идентификации в лабораторной диагностике для определения микроорганизмов все чаще применяется метод ПЦР. Универсальность, высокая чувствительность и относительная простота исполнения сделали метод ПЦР незаменимым для решения таких задач диагностики, как прямое обнаружение и идентификация микроорганизмов, анализ мутаций, связанных с генетическими заболеваниями у человека и идентификация личности человека [10].

### 1.3 ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) - макромолекула, обеспечивающая хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов.

В большинстве случаев макромолекула ДНК состоит из двух цепей, ориентированных азотистыми основаниями друг к другу. Эта двухцепочечная молекула спирализована. В целом структура молекулы ДНК получила название «двойной спирали». Остов каждой из цепей состоит из чередующихся фосфатов и сахаров [11]. Внутри одной цепи ДНК соседние нуклеотиды соединены фосфодиэфирными связями, которые формируются в результате взаимодействия между 3'-гидроксильной группой молекулы дезоксирибозы одного нуклеотида и 5'-фосфатной группой другого. Асимметричные концы цепи ДНК называются 3' и 5'. Полярность цепи играет важную роль при синтезе ДНК (удлинение цепи возможно только путём присоединения новых нуклеотидов к свободному 3'-концу).

В ДНК встречается четыре вида азотистых оснований. Азотистые основания одной из цепей соединены с азотистыми основаниями другой цепи водородными связями согласно принципу комплементарности. Последовательность нуклеотидов позволяет «кодировать» информацию о различных типах РНК, наиболее важными из которых являются информационные, или матричные (мРНК), рибосомальные (рРНК) и транспортные.

Исходя из структуры молекул, основания, входящие в состав нуклеотидов, разделяют на две группы: пурины (аденин и гуанин) образованы соединёнными пяти- и шестичленным гетероциклами; и пиримидины (цитозин и тимин) — шестичленным гетероциклом.

В двойной спирали различают малую (12 Å) и большую (22 Å) бороздки [12]. Белки и факторы транскрипции обычно взаимодействуют с основаниями, расположенными в большой бороздке.

Воспроизведение молекулы ДНК основано на том, что каждая цепь двойной спирали служит матрицей для сборки новых молекул. Открытие ДНК, как и практически все великие открытия, не было результатом работы одинокого гения, а увенчало собой длинную цепь экспериментальных работ [13]. Например, эксперимент Херши—Чейза продемонстрировал, что носителем генетической информации в клетках является именно ДНК, а не белки. Еще в 1920-е годы американский биохимик Фибус Левин (Phoebus Levene) установил, что основа ДНК, — это пятиатомный сахар дезоксирибоза; фосфатная группа и четыре азотистых основания. В конце 1940-х годов американский биохимик Эрвин Чаргафф выяснил, что во всех ДНК содержится равное количество оснований Т и А и, аналогично, равное количество оснований Г и Ц, процент соотношения Т\А и Г\Ц является важнейшей видоспецифичной характеристикой.

#### **1.4 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. Генетическая система бактерий состоит из нуклеоида и вненуклеоидных структур. Аналог ядра прокариотов значительно отличается от ядра эукариотических клеток. Он представлен нуклеоидом [14], лишенным оболочки и включающем в себя почти всю ДНК бактерии. Бактериальный нуклеид обычно состоит из одной двунитевой молекулы ДНК кольцевой формы. Наследственная информация у бактерий хранится в форме последовательности нуклеотидов ДНК, которая определяет последовательность аминокислотных остатков в молекуле белка. ДНК прокариот имеет существенные отличия в структурной организации от эукариотической ДНК: нуклеоид бактерий не имеет ядерной оболочки, ядрышка и основных белков гистонов (имеются гистоноподобные 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, которые отличаются числом и специфичностью последовательности нуклеотидов, в которых обычно зашифрована информация о структуре и свойствах белков. Каждому белку соответствует свой ген, т.е., дискретный участок на ДНК, отличающийся числом и специфичностью последовательности нуклеотидов. 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 [15].

В клетках бактерий и архей кольцевые или линейные молекулы ДНК прикреплены изнутри к клеточной мембране. У них и у низших эукариот кроме хромосомальной (нуклеоидной) ДНК встречаются также небольшие автономные, преимущественно кольцевые молекулы ДНК, называемые плазмидами. Плазмиды - кольцевые ДНК длиной от нескольких тысяч до сотен тысяч п.о Их число в каждом микроорганизме может варьировать [16]. Плазмиды – автономно реплицирующиеся внехромосомные генетические элементы. В отличие от хромосом плазмиды являются «необязательным» генетическим материалом, потеря которого не приводит к гибели клетки. Однако многие крупные плазмиды содержат гены, которые отвечают за важные для клетки функции, нужные 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 [17].

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 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 плаزمидях, мобильных элементах, которые не обязательно присутствуют во всех штаммах одного вида [18].

Бактериальный нуклеоид содержит до 4000 отдельных генов. Размеры бактериального нуклеоида у различных представителей царства Procaruotaе варьируют от  $3 \times 10^8$  до  $3 \times 10^9$ Д.

### **1.5 Ген 16S рРНК**

Идеальным маркером для идентификации микроорганизмов оказался ген, кодирующий 16S рибосомальную РНК [19]. Этот ген есть в геноме всех известных бактерий и архей, но отсутствует у вирусов и в ядерных хромосомах эукариот. Ген 16S рРНК есть в эукариотах в митохондриальной ДНК. Этот ген имеет как консервативные участки так и видоспецифичные [20, 21] Консервативные участки можно использовать для первого этапа полимеразной цепной реакции — присоединения праймеров к исследуемой нити ДНК, а видоспецифичные — для определения видов. Степень схожести видоспецифичных участков очень хорошо отражает эволюционное родство разных видов.

Нуклеотидные последовательности 16S рРНК многих известных бактерий и архей доступны. Выявленные последовательности изучаемых микроорганизмов можно сравнить с присутствующими в базах данных и идентифицировать вид бактерии. В последнее время идет интенсивный пересмотр старой, фенотипической, классификации бактерий, основанной на плохо формализуемых критериях — от внешнего вида колоний до способности окрашиваться разными красителями. Новая систематика опирается на

молекулярные критерии (нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК) и только отчасти повторяет фенотипическую.

## **1.6 Выделение ДНК**

Выделение ДНК и РНК — необходимый шаг подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами. Многие биохимические процессы, такие как амплификация, проведение обратной транскрипции, сиквенс, гибридизация, синтез ДНК, не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительного выделения и очистки нуклеиновых кислот. Существует несколько общепризнанных методов получения ДНК из биологического материала, и в зависимости от поставленной задачи [22] нужно выбрать наиболее оптимальную методику. При выборе нужно помнить про несколько требований, предъявляемых к конечному результату, например - высокий выход нужного материала; время, требуемое для получения конечного продукта; высокое качество полученного материала. В литературе описано множество методов, позволяющих выделять нуклеиновые кислоты из разнообразных биологических материалов, однако не все пригодны для автоматизации этого процесса, более того на многих стадиях выделения присутствует высокий риск контаминации полученного препарата. [23]. Методы выделения ДНК можно разделить на жидко - и твердофазные методы.

Жидкофазные методы применяются когда требуется лизис биологического материала (например кровь или ткань) детергентами или хаотропными веществами. После стадии лизиса следует несколько стадий в которых применяют органические растворители (фенол, хлороформ или этанол). При помощи перхлората натрия [24] можно достигнуть полного разделения белков и нуклеиновых кислот. Стандартная методика получения чистого препарата основана на том, что ДНК является полярной молекулой и не растворяется в органических растворителях. Традиционно для выделения ДНК



используется фенол-хлороформная экстракция. При перемешивании клеточного лизата и фенола формируются две фазы. ДНК находится в верхней (водной) фазе, а денатурированные белки — в нижней (органической) фазе [25]. В этом способе присутствует несколько стадий центрифугирования и жидкостной экстракции, поэтому данный способ нельзя автоматизировать.

Существует несколько методов, согласно которым из одного образца можно выделить одновременно ДНК и РНК [26]. При этом используются сильные хаотропные агенты, такие как гуанидин тиоцианат и цезия трифлуороацетат для одновременного разрушения клеточных мембран и инактивации внутриклеточных рибонуклеаз (РНКаз). Лимитирующими факторами таких методик являются необходимость ультрацентрифугирования и большое время анализа (16–44 ч) [27].

В твердофазных методах выделения нуклеиновых кислот используются следующие процессы и принципы: водородные связи с немодифицированной гидрофильной матрицей; ионообмен в водном растворе; аффинность; механизмы исключения по размеру. Твердофазные системы, адсорбирующие нуклеиновые кислоты, — это частицы на основе кварца, стеклянные волокна, анионообменные носители [28], которые используются в хромато- графических сепарационных колонках.

Очень удобным является метод выделения нуклеиновых кислот, предложенный Santosa [29]. Этот метод включает в себя стадию лизиса клеток сильным хаотропным агентом, который разрушает клеточные мембраны и дезактивирует внутриклеточные РНКазы, потом происходит сорбция нуклеиновой кислоты на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное "молоко" и т. д.). Нуклеиновая кислота обратимо связывается со стеклом в присутствии высокой концентрации хаотропных солей (гуанидин хлорида, гуанидин тиоцианата). В таких условиях связывания белков с матрицей не происходит. Очищенная нуклеиновая кислота снимается со стекла буфером с низкой ионной силой. В настоящее время многие коммерческие

фирмы предлагают для выделения нуклеиновых кислот колонки со стеклянной матрицей (например, Zymo Research, Axugen и Promega).

## 1.7 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 [30].

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.

В основе метода ПЦР лежит природный процесс - комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция носит название репликации ДНК.

Естественная репликация ДНК включает в себя несколько стадий:

- 1) Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК);
- 2) Образование коротких двухцепочечных участков ДНК (затравок, необходимых для инициации синтеза ДНК);
- 3) Синтез новой цепи ДНК (комплементарное достраивание обеих нитей).

Сущность метода заключается в специфической амплификации ДНК с помощью полимеразы, осуществляющей избирательный синтез взаимно-комплементарных цепей ДНК, начиная с двух праймеров. Праймеры комплементарны противоположным цепям ДНК в участках, ограничивающих выбранную область ДНК, и ориентированы 3'-концами навстречу друг другу и в сторону той последовательности, которую необходимо амплифицировать. Длина амплифицируемого фрагмента определяется расстоянием между

праймерами. Используя в качестве матрицы любые образцы ДНК, содержащие амплифицируемую последовательность, можно увеличить количество копий изучаемого фрагмента ДНК в сотни миллионов раз [31].

Для проведения ПЦР требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера - искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 18 до 30 п.н., идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы.).
- 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), *Puococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Puococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.
- Дезоксинуклеотидтрифосфаты (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.
- Ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.
- Анализируемый образец - подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который содержит искомую ДНК. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется

Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется.

Добавление пирофосфатазы может увеличить выход ПЦР-реакции. Этот фермент катализирует гидролиз пирофосфата, побочного продукта присоединения нуклеотидтрифосфатов к растущей цепи ДНК, до ортофосфата. Пирофосфат может ингибировать ПЦР-реакцию [32].

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 [33].

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходит ряд событий, обеспечиваемых определенными температурными циклами. Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий.

**1. Денатурация.** На первом этапе необходимо расплести двойную цепь ДНК, находящуюся в образце. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96°С (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимеразы) на 0,5—2 мин., чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Иногда перед первым циклом (до добавления полимеразы) проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 мин. для полной денатурации матрицы и праймеров. Такой приём называется горячим стартом, он позволяет снизить количество неспецифических продуктов реакции.

**2. Отжиг.** На втором этапе праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Праймеры подбирают так, что они ограничивают искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК.

Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина - цитозин. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит. Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 4—5°C ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5—2 мин. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

После отжига праймеров Таq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера.

**3. Элонгация (синтез).** На третьем этапе температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Таq-полимеразы, и синтез второй цепи продолжается с максимальной эффективностью. ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Таq и Pfu наиболее активны при 72 °C. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7-10 мин [34].

## 1.8 Эндонуклеазы рестрикции

Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы (от лат. restrictio — ограничение) — группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных ДНК в большинстве прокариотических и некоторых других организмах. Это ферменты, «узнающие» определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК. Их выделяют преимущественно из прокариотических клеток.

В отличие от экзонуклеаз, рестриктазы 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 его.

Выделяют три основных типа (или класса) ферментов рестрикции, сайты узнавания для которых могут быть симметричными (палиндромными) и несимметричными:

- Рестриктазы первого типа (например, *EcoK* из *Escherichiacoli K12*) узнают определённую последовательность нуклеотидов и разрезают двухцепочную молекулу ДНК неподалёку от этой последовательности в произвольной точке и само место разреза не строго специально.
- Рестриктазы второго типа (например, *EcoRI*) узнают определённую последовательность и разрезают двойную спираль ДНК в определённой фиксированной точке внутри этой последовательности.
- 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). Эти рестриктазы узнают асимметричные сайты [35].

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 [36].

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 [37].

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.

При использовании нескольких эндонуклеаз рестрикции на одном образце 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 [38].

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.

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

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

При использовании данного метода получают различные результаты от различных образцов, и можно идентифицировать некоторые различия в последовательности нуклеотидов ДНК, в случае, когда они располагаются в сайте рестрикции. Анализ разнообразия ПДРФ является важным инструментом в картировании генома, локализации генов, ответственных за генетические заболевания, определения риска заболевания, получения генетических отпечатков и определения родства. Полное совпадение рестрикционных картин



по нескольким рестриктазам указывает на близкородственность данных штаммов.

В последнее время используют преимущественно метод анализа ПДРФ в сочетании с полимеразной цепной реакцией (ПЦР) [39].

### **1.10 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 [40].

Электрофорез является одним из наиболее важных методов для разделения и анализа компонентов веществ в химии. Этот метод находит широчайшее применение для разделения смесей биомолекул на фракции или индивидуальные вещества. Он используется в биохимии, молекулярной биологии, клинической диагностике, популяционной биологии [41].

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 под действием приложенного электрического поля заставляет молекулы двигаться 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.

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.

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

Кроме того, при разделении в геле прямо следят за положением ДНК, так как полосы ДНК в геле можно окрашивать флуоресцирующим в ДНК красителем – бромистым этидием в низкой концентрации. Просматривая прокрашенный гель в ультрафиолетовом свете, можно заметить даже 1 нг ДНК.

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

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

Для электрофореза применяются трис-ацетатные, трис-боратные или трис-фосфатные буферы в концентрации 50 мМ с рН от 7,5 до 7,8.

Электрофорез является одним из методов определения количества и качества ДНК. Этот метод позволяет определить приблизительную концентрацию ДНК. Она определяется сравнением исследуемой ДНК со стандартными разведениями ДНК-маркера известной молекулярной массы, концентрация которого известна. После электрофореза и окрашивания геля сравнивают интенсивность свечения полос ДНК в исследуемых и эталонных образцах.

### **1.11 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: теоретическую амплификацию, рестриктирование, электрофорез. Геномы могут иметь длину до нескольких миллиардов пар нуклеотидов. Данный метод позволяет анализировать различные геномы за короткое время, осуществлять поиск нужных последовательностей ДНК, РНК, белков и работать с ними.

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 [42, 43].

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

## **2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Объект исследования**

Образцы бактерий были предоставлены нам магистрантом кафедры биотехнологии Ларьковой Анной Николаевной.

### **2.2 Методика выделения ДНК**

Методика выделения ДНК с помощью набора SILICA *uni* основана на сорбции преимущественно высокомолекулярной фракции нуклеиновых кислот суспендированными частицами оксида кремния, что позволяет производить пробоподготовку для ПЦР с минимальными потерями, и обуславливает качество препарата ДНК, оптимальное для ПЦР. Основной компонент лизирующей смеси – гуанидинтиоцианат. Продолжительность подготовки образцов с помощью набора SILICA *uni* составляет около 1 часа. Полученные препараты ДНК можно сразу использовать для ПЦР без определения концентрации ДНК в них и дополнительного разбавления.

Набор реагентов SILICA *uni* применяется для выделения ДНК из большинства живых тканей и биологических жидкостей животного, растительного и микробиологического происхождения.

Набор реагентов SILICA *uni* основан на использовании лизирующего буфера с гуанидинтиоцианатом, который предназначен для лизиса клеток, солюбилизации клеточного дебриса, а также для денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии лизирующего буфера ДНК активно связывается с сорбентом, затем легко отмывается от белков и солей отмывочными спиртовыми буферами. ДНК, элюированная из сорбента буфером TE может быть напрямую использована для ПЦР [44].

### **2.3 Методика проведение ПЦР**

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера (затравки, необходимые для инициации синтеза ДНК), комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК.
- Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

На одну пробу объемом 50мкл требуется:

- - 27 мкл дист. воды
- - 5 мкл 10x буфера
- - 5 мкл + 5 мкл праймеров с концентрациями по 1μM (1350 R - 500 L; 8F – 1492L)
- - 3 мкл  $MgCl_2$  с концентрацией 2.5mM

Все вещества смешивали в 1 пробирке объемом 1,5 мл из расчета на 13 проб, затем в каждую было добавлено по 47 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемой ДНК. После горячего старта в каждую из пробирок добавили по 1 мкл ДНК Tag - полимеразы.

Ход реакции:

Проведение ПЦР – процесс сложный и занимает приблизительно 25-30 циклов. Каждый из циклов состоит из трех стадий. Это нужно для получения достаточного количества копий искомого характеристического фрагмента ДНК.

1. Горячий старт – одна из первых стадий. ДНК нагревают до 96°C в течение

трех минут. Затем температуру понижают до 72°C, чтобы добавить фермент. Далее фермент нет необходимости добавлять, поскольку ДНК-полимеразу изготавливают из термофильных бактерий. Поэтому она термостабильная и способна выдерживать высокие температуры.

2. Денатурация. На этой стадии происходит расплетение нитей ДНК под действием на нее высокой температуры- 95 °С. Длительность – две минуты.

3.Отжиг. Здесь происходит присоединение праймеров с соответствующими последовательностям на противоположных цепях ДНК. Температура составляет 57°C (подобрана экспериментальным путем), длительность –20 секунд.

4.Синтез (элонгация). Синтез производится при температуре приблизительно 72°C. Температура зависит от размера куска ДНК и от используемой полимеразы. После синтеза идет повтор циклов.

5.Финальная элонгация. Используется для окончательного достраивания всех одноцепочечных фрагментов. На все это уходит 7-10 минут.

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

Используемая программа при проведении 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.

Для визуализации результатов амплификации использовали электрофорез. После окончания электрофореза гель помещали в транслюминатор гель-документирующей системы. Проведенный электрофорез ампликонов ДНК показал что реакция ПЦР прошла успешно и мы смогли

выделить участки ДНК гена 16S рРНК длиной 900 пар оснований.

## **2.4 Методика проведения реакции рестрикции**

Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 2 ч. в приборе Thermomixercomfort производство фирмы Eppendorf. Реакция проходила при 37 °С в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 ед. акт. рестриктазы.

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

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

Все вещества смешали в 1 пробирке объемом 2 мл, из расчета на 13 проб, затем в каждую пробирку добавили по 35 мкл данной смеси и по 15 мкл исследуемой ДНК. Смесь готовили на ледяной подставке.

Для визуализации результатов рестрикции использовали электрофорез.

Все использованные нами рестриктазы имеют тетра nukлеотидный сайт узнавания, что позволило получить от 3 до 7 фрагментов ДНК в результате расщепления продуктов амплификации, имеющих длины порядка 900 пар оснований.

## **2.5 Методика проведения электрофореза**

*Оборудование для проведения электрофореза:*

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



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

3. Гель - документирующая система Bio-RadGelDocXR с компьютером.

*Реактивы, необходимые для проведения электрофореза:*

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

Для проведения горизонтального электрофореза готовят пластину агарозного геля, представляющей собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере (в трис-боратном) агарозу в концентрации 1.7%. Застывшая агароза образует пространственную решетку. При заливке с помощью гребенки формируем в геле специальные лунки, в которые, после затвердевания геля, вносят продукты амплификации. Далее, пластина геля помещается в аппарат для горизонтального гель-электрофореза(гель 7x10) Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad) и подключается источник постоянного напряжения (Bio-Rad PowerPac) -85V в течении 2ч. По окончанию разделения подложку с гелем извлекаем из кюветы и помещаем гель вместе с подложкой в красящий раствор (0,5мг/лбромистого этидия, 20мин). После прокрашивания гель промывают в воде в течение 2 мин и переносят подложку в камеру трансиллюминатора геле-документирующей системы(Bio-Rad Gel Doc XR с компьютером), излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне.Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярной массы ДНК (100bp и 100bp+50 bp ДНК маркеры, НПО "СибЭнзим").

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1. Выделение ДНК из образцов бактерий

Из 12 образцов почвенных бактерий была выделена ДНК, были определены 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	39	1,83
2	45	1,90
3	43	1,94
4	41	1,87
5	51	1,85
6	56	1,80
7	53	1,97
8	44	1,91
9	39	1,89
10	52	1,98
11	38	1,81
12	36	1,88

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.



### **3.2. Получение ампликонов гена 16S рРНК**

### **3.3. Проведение реакции рестрикции ампликонов 500L-1350R**

Полученные ампликоны были подвергнуты рестриктированию с использованием 6 эндонуклеаз рестрикции: использованием эндонуклеаз рестрикции.

После проведения экспериментального электрофореза и документирования результатов, сравнив положение рестриктов с маркерами, для каждого образца исследуемых бактерий определили приблизительные размеры полученных рестриктов (Таблица 2).

### **3.4.Проведение анализа *in silico***











После проведения анализа *in silico* сравнили полученные результаты.

### **3.5. Сравнение экспериментальных и теоретических данных**

Теоретические электрофореграммы, составленные *in silico*, сравнивались с практическими, полученными после электрофоретического разделения продуктов гидролиза ампликонов в агарозном геле (рис. 4-15).









## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы была выделена ДНК высокого качества. Были получены ампликоны гена 16S рРНК соответствующих длинам около 900 п.о. С полученными ампликонами были проведены реакции рестрикции. Был проведён рестрикционный анализ *in silico* различных штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, в результате которого установили размеры рестриктов при использовании эндонуклеаз, характерные для данного рода. По результатам сравнения теоретических и практически полученных электрофореграмм было установлено, что к роду *Pseudomonas* принадлежит образец бактерий под номером 5.

Метод анализа ПДРФ может служить способом идентификации микроорганизмов. В ходе работы было показано, что его можно использовать для определения микроорганизмов.



## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

рРНК - рибосомальная РНК

РНК - рибонуклеиновая кислота

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПДРФ - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

П.О. - пар оснований

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

*E. coli* – *Escherichia coli*

dTTP – дезокситимидин трифосфат

dGTP – дезоксигуанозин трифосфат

dCTP – дезоксицитидин трифосфат

dATP – дезоксиаденозин трифосфат

#### 4 Список литературы

1. Von Graevenitz A. Ecology, clinical significance and antimicrobial susceptibility of infrequently encountered glucose-nonfermenting gram-negative rods – 1985.- 181-223 с.
2. Смирнов В. В., Киприанова Е. А. Бактерии рода *Pseudomonas* — продуцентыновых антибиотиков. Механизмы биосинтеза антибиотиков: книга — Москва: 1986. - 149-160 с.
3. 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.
4. Воробьев А. В., Быков А. С., Пашков Е. П., Рыбакова А. М. Микробиология: Учебник. — 2-е изд. перераб. и доп. — М.: Медицина, 2003. — 336 с.
5. Покровский В.И. Медицинская микробиология / Покровский В.И., - Москва: ГЭОТАР медицина, 1999. - 768с.
6. Онищенко, Г. Г. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей: методические указания / Г. Г. Онищенко. - Москва: Минздрав России, 2003. –37 с.
7. Воробьев, А. А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник / А. А. Воробьев. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2004. - 690 с.
8. Асонов, Н. Р. Микробиология: учебник / Н. Р. Асонов. - Москва: Колос-Пресс, 2002. - 352 с.
9. Покровский, В. И. Инфекционные болезни и эпидемиология: учебник / В. И. Покровский, С. Г. Пак. - 2-е изд. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 697с.
10. Покровская, М. С. Лабораторная диагностика ЗППП и полимеразная цепная реакция: лекция [Электронный ресурс] / к.б.н. М. С. Покровская, Г. Б. Смирнов // ЗАО ЛагиС. – 2002. Режим доступа: [http://lages-lab.ru/article\\_11.htm](http://lages-lab.ru/article_11.htm)
11. Ghosh, A. A. glossary of DNA structures from A to Z / A. Ghosh, M. Bansal // Acta Crystallographica Section D. - 2003. - №59. - P. 620-626.
12. Pabo, C. Protein - DNA recognition / C. Pabo, R. Sauer // Annual Review Biochemistry. - 1984. - № 53. - P. 293 – 321.

13. Persson, F. Fluorescence Microscopy of Nanochannel-Confined DNA / F. Persson, F. Westerlund // *Single Molecule Analysis*. - 2011. - № 783. - P. 159-179.
14. Патрушев, Л. И. Экспрессия генов / Л. И. Патрушев. - Москва : Наука, 2000. - 830 с.
15. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева — Москва : Изд-во МГУ, 2004. — 448 с.
16. Попова, Н. А. Введение в биологию : учебное пособие / Н. А. Попова. - Новосибирск : Новосиб. гос. университет, 2012. - 270 с.
17. Квитко, К. В. Генетика микроорганизмов : учебное пособие / К. В. Квитко, И. А. Захаров; под ред. А. В. Пиневича. - Санкт Петербург : Изд. дом СПб. ун-та, 2012. - 268 с.
18. Шестаков, С. В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий / С. В. Шестаков // *Экологическая генетика* - 2007. - Т. 5, № 2. - С. 12–24.
19. Жимулев, И. Ф. Общая и молекулярная генетика / И. Ф. Жимулев. - Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2003. - 480 с.
20. Патрушев, Л. И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. - Москва : Наука, 2004. - 530 с.
21. Колтовая, Н. А. Практикум по молекулярной биологии / Н. А. Колтовая. - Москва : Наука, 2010. - 31 с.
22. Copeland, W. C. Mitochondrial DNA Methods and Protocols / W. C. Copeland // *MMB*. - 2002. V. 197. - P. 199-212.
23. Moss, D. An Easily Automated, Closed-Tube Forensic DNA Extraction Procedure Using a Thermostable Proteinase / D. Moss, S. A. Harbison, D. J. Saul // *Int. J. Legal Med.* - 2003. V. 117. - P. 340–349.
24. Rapley, R. The Nucleic Acid Protocols Handbook / R. Rapley // University of Hertfordshire, Hatfield UK, 2000. - P. 3-9.


25. Chachaty, E. Isolating Chromosomal DNA from Bacteria / E. Chachaty, P. Saulnier. // The Nucleic Acid Protocols Handbook, Springer. - 2000. - P. 29-32.
26. Антонова, О. С. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии / О. С. Антонова, Н. А. Корнева, Ю. В. Белов, В. Е. Курочкин // Научное приборостроение. - 2010. - Т. 20, - № 1. - С. 3-9.
27. Perry, D. Isolation of DNA and RNA / D. Perry, J. David // Methods in Molecular Medicine. - 2001. - V. 31. - P. 25-30.
28. Teeters, M. A. Adsorptive Membrane Chromatography for Purification of Plasmid DNA / M. A. Teeters, S. E. Conrardy, B. L. Thomas // J. Chromatography. - 2003. - V. 989. - P. 165–173.
29. Santosa, D. A. Rapid extraction and purification of environmental DNA for molecular cloning applications and molecular diversity studies / D. A. Santosa //Molecular Biotechnology. - 2001. - V. 17, № 1. - P. 59.
30. 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. – 40-45 с.
31. Гусейнов, О. А. Методы биохимических исследований : учеб. метод. пособие к лаб. занятиям / О. А. Гусейнов. - Красноярск: Сиб. федерал. университет, 2012. - 46 с.
32. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. - Изд. 3<sup>-е</sup> - Москва : Медицина, 2007. - 700 с.
33. Оберемок, В.В. Методические рекомендации к применению ПЦР-метода / В.В. Оберемок : методические указания. – Симферополь, 2008. – 35 с.
34. Лопухов, Л. В. 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 с.

35. Альбертс, Б. Молекулярная биология клетки: в трех томах. 2 / Альбертс Б. и др. // Москва: Мир, - 1994. - Т. 1. - 517 с.
36. 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.
37. Зернов, Ю. П. Использование рестрикционного анализа амплифицированного гена 16S РНК для идентификации микроорганизмов на примере бактериальных продуцентов термолabileй щелочной фосфатазы / Ю. П. Зернов, М. Л. Абдурашитов, С. Х. Дегтярев // Биотехнология. – 2005. – №. 6. – С. 3 – 11.
38. 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.
39. ПДРФ [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/RFLP.html>
40. Гааль, Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул:учебник / Гааль Э., Медьеши Г., Верецкеи Л. // Москва: Мир, - 1982 -447с.
41. Сова В.В.,Кусайкин М.И. Методическое пособие к практическим занятиям по очистке белков. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006
42. 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)
43. . 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.
44. Выделение ДНК [электронный ресурс] – режим доступа [http://medprom.ru/medprom/mpp\\_0000367](http://medprom.ru/medprom/mpp_0000367)

45. National Center for Biotechnology Information – [электронный ресурс] :  
режим доступа <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
46. pDRAW32 [электронный ресурс] – режим доступа: <http://www.acaclone.com>

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

«Идентификация бактерий рода *Pseudomonas* методом анализа полиморфизма  
длин рестрикционных фрагментов ампликона 500L-1350R гена 16S рРНК»

Научный руководитель


доцент, к.б.н.

О. А. Гусейнов

Выпускник

Н.С. Евсеенко