

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Е. И. Шишацкая

« ____ » _____ 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Современные методы идентификации бактерий-антагонистов грибов.

06.04.01 - Биология

06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель	_____	<u>к.б.н. О.А.Гусейнов</u>
	подпись, дата	инициалы, фамилия
Выпускник	_____	<u>З.В. Кузнецова</u>
	подпись, дата	инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>Л.С. Смирнова</u>
	подпись, дата	инициалы, фамилия

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме "Современные методы идентификации бактерий-антагонистов грибов" содержит 63 страниц текстового документа, 24 иллюстрации, 6 таблиц, 62 использованных источников.

Ключевые слова: антагонисты грибов, ПДРФ, ген 16S рРНК.

Цель данной работы: используя метод анализа ПДРФ гена 16S-рРНК с использованием рестриктаз Rsa I, Tru1 I, Bsn I, Sse9 I и BstНН I идентифицировать предоставленные образцы бактерий-антагонистов грибов.

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

- 1) Провести анализ ПДРФ *in silico* ампликонов 500F-1350R и 8F-1492R гена 16S-рРНК бактерий с использованием данных GenBank для рестриктаз Rsa I, Tru1 I, Bsn I, Sse9 I, BstНН I и построить теоретические электрофореграммы;
- 2) Выделить ДНК из биомассы бактерий-антагонистов грибов, определить её концентрацию и качество;
- 3) С помощью ПЦР получить и очистить ампликоны 500F-1350R и 8F-1492R гена 16S рРНК исследуемых бактерий, подвергнуть ампликоны рестрикции с использованием рестриктаз Tru1 I, Rsa I, Bsn I и проанализировать полученные продукты с помощью электрофореза;
- 4) Сравнить полученные *in silico* и практически картины электрофоретического разделения рестриктов и идентифицировать виды бактерий.

Одним из перспективных и современных методов идентификации микроорганизмов является идентификация по маркерному гену 16S рРНК. Особенности расположения вариативных и консервативных участков этого гена представляют отдельный интерес. Поэтому детальное изучение последовательностей нуклеотидов в данном гене может помочь при идентификации микроорганизмов.

Метод анализа ПДРФ гена 16S рРНК при условии соответствующего подбора эндонуклеаз рестрикции, может служить удобным подспорьем для определения вида микроорганизмов в дополнении к традиционным методам.

Содержание:

ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1. 1 ДНК.....	8
1. 2 Генетическая система бактерий	9
1. 3 Ген 16S рРНК.....	11
1. 4 Бактерии-антагонисты грибов	12
1. 5 Сравнительная характеристика ризосферных и эндофитных бактерий...	13
1. 6 Биоразнообразие бактериальных эндофитов	14
1. 7 Механизмы, используемые бактериями, для подавления жизнедеятельности грибов	15
1. 8 Выделение ДНК лизисным методом	18
1. 9 Полимеразная цепная реакция.....	19
1. 10 Термостабильные ДНК-полимеразы.....	21
1. 11 Электрофорез.....	22
1. 12 Методы идентификации бактерий.....	23
1. 13 FISH метод.....	24
1. 14 Секвенирование.....	25
1. 15 Количественная ПЦР	26
1. 16 Рестриктивный анализ ДНК	27
1. 17 Метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов	28
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	30
2.1 Используемые образцы биомассы почвенных бактерий	30
2.2 Методика выделения ДНК.....	30

2.3	Методика проведения электрофореза	31
2.4	Методика проведения ПЦР	32
2.5	Проведение реакции рестрикции	33
2.6	Методика анализа <i>in silico</i>	35
3	РЕЗУЛЬТАТЫ	Error! Bookmark not defined.
3.1	Проведение анализа <i>in silico</i>	Error! Bookmark not defined.
3.2	Выделение ДНК из биомассы бактерий.....	Error! Bookmark not defined.
3.3	Получение ампликонов гена 16S рРНК	Error! Bookmark not defined.
3.4	Проведение реакций рестрикции	Error! Bookmark not defined.
3.5	Сравнение теоретических и практических данных .	Error! Bookmark not defined.
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	37
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	39
	SUMMARY	40
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:	41

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии – древнейшая группа организмов. Люди научились их использовать в пищевой промышленности, в сельском хозяйстве, в медицине, при добыче полезных ископаемых и во многих других сферах жизни человека. В то же время многие бактерии являются причиной различных заболеваний.

Многие виды бактерий ответственны за важные аспекты жизни, поэтому необходимо уметь быстро и точно идентифицировать их.

Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ, Amplified rDNA Restriction Analysis – ARDRA) является одним из наименее недорогих, а главное быстрых методов идентификации бактерий. Используя данный метод, результат можно получить в течение дня.

В данной работе показано применение метода анализа ПДРФ для идентификации микроорганизмов-антагонистов грибов.

Актуальность работы

Многие бактерии являются промышленными продуцентами:

1. Ферментов;
2. Фунгицидов и антибиотиков нового поколения;
3. Аминокислот;
4. Витаминов;
5. Фитогормонов [1].

Бактерии активно способствуют росту растений в сельском хозяйстве, садоводстве и лесоводстве, а также экологической очистке (фиторемедиации). В связи с этим было бы полезно иметь более глубокое понимание ассоциаций между различными типами эндофитов на агрономически важных растениях, данные знания расширят понимание экологической роли микроорганизма внутри растительных сообществ.

Другой, не менее важной задачей является исследование фунгицидных соединений, синтезируемых эндофитами. Это имеет важное значение для

медицины, поскольку данные соединения могут являться лекарственными средствами, обладающими низкой токсичностью для человека. Данные вещества можно было бы применять при лечении грибковых заболеваний у человека, зачастую возникающими после избыточного применения антибиотиков, широко применяемых для лечения бактериальных инфекций.

В связи с вышеизложенным существует необходимость уметь точно и правильно идентифицировать виды бактерий-антагонистов грибов. Поэтому мы решили найти относительно дешевые и информативные рестриктазы для идентификации данных бактерий.

Цель данной работы: используя метод анализа ПДРФ гена 16S-rРНК с использованием рестриктаз Rsa I, TruI I, Bsn I, Sse9 I и BstНН I идентифицировать предоставленные образцы бактерий-антагонистов грибов.

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

- 1) Провести анализ ПДРФ *in silico* ампликонов 500F-1350R и 8F-1492R гена 16S-rРНК бактерий с использованием данных GenBank для рестриктаз Rsa I, TruI I, Bsn I, Sse9 I, BstНН I и построить теоретические электрофореграммы;
- 2) Выделить ДНК из биомассы бактерий-антагонистов грибов, определить её концентрацию и качество;
- 3) С помощью ПЦР получить и очистить ампликоны 500F-1350R и 8F-1492R гена 16S rРНК исследуемых бактерий, подвергнуть ампликоны рестрикции с использованием рестриктаз TruI I, Rsa I, Bsn I и проанализировать полученные продукты с помощью электрофореза;
- 4) Сравнить полученные *in silico* и практически картины электрофоретического разделения рестриктов и идентифицировать виды бактерий.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) - макромолекула, состоящая из повторяющихся нуклеотидов и обеспечивающая хранение, а также передачу генетической информации из поколения в поколение. Структура макромолекулы представлена «двойной спиралью» [1].

ДНК у высших организмов находится в ядре клетки. ДНК бактерий имеет кольцевую структуру и присоединена изнутри к плазмалемме. У бактерий также встречаются плазмиды - небольших размеров, автономные молекулы ДНК [2].

Молекула ДНК состоит из двух цепей с азотистыми основаниями, расположенными друг напротив друга, и закручена в виде спирали. В ней содержится всего четыре основания: гуанин, тимин, аденин, цитозин. По принципу комплементарности азотистые основания одной из цепей связаны с азотистыми основаниями другой цепи водородными связями: аденин соединяется только с тимином (между этими основаниями образуются две водородные связи), гуанин — только с цитозином (образуются три водородные связи) [3].

Эта особенность ДНК позволяет однозначно восстановить последовательность нити, имея на руках ее комплементарную копию. Нуклеотидная последовательность предоставляет возможность «кодировать» информацию о различных типах РНК (информационных, рибосомальных и транспортных).

Двойная спираль ДНК, как правило, не взаимодействует с другими сегментами ДНК, и в клетках человека хромосомы пространственно разделены между собой в ядре [4]. Данное расстояние между хромосомами необходимо для того, чтобы ДНК могла действовать в качестве стабильного носителя информации. Рекомбинация позволяет хромосомам обмениваться

генетической информацией, что в итоге приводит к образованию новых комбинаций генов.

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

1. 2 Генетическая система бактерий

Генетическая система бактерий состоит из нуклеоида (аналог ядра) и внуклеоидных структур. Нуклеоид лишен оболочки и включает в себя практически весь генетический материал микроорганизма. Он состоит из одной-двух “нитей” молекулы ДНК кольцевой формы. Аналог ядра прокариот (нуклеоид) сильно отличается от ядра эукариот [6]. Отличия в структурной организации ДНК: нуклеоид прокариот не имеет кариолеммы, ядрышка и основных белков гистонов (есть только белки, подобные им - HU, H-NS, IHF и FIS, которые участвуют в компактизации ДНК). Геном компактен, количество “мусорной ДНК” минимально, гены не имеют интронов (кроме архей).

Генетическая информация у микробов хранится в виде последовательности нуклеотидов, в свою очередь данная последовательность определяет состав и порядок аминокислот в белковой молекуле. Гены – дискретные части ДНК, отличающиеся длиной и определенным порядком расположения нуклеотидов. Каждый белок имеет соответствующий ему ген. У прокариот в отличие от эукариот используются несколько рамок считывания, что повышает возможности кодирования ДНК без увеличения её размеров [7].

В клетках прокариот кольцевые или линейные молекулы ДНК прикреплены изнутри к плазмалемме. У них и у низших эукариот кроме хромосомальной (нуклеоидной) ДНК встречаются плазмиды - кольцевые

двучепочечные молекулы размером от нескольких тысяч до сотен тысяч п.о. Количество плазмид в каждой бактерии может варьировать [8]. Репликация плазмид происходит, как независимо от нуклеоида, так и зависимо от него. В сравнении с нуклеоидом плазмиды не несут в себе жизненно необходимых генов [9]. Но существуют плазмиды с генами, отвечающими за значимые функции, необходимые в определенных экологических нишах. Приобретаемые новые признаки обычно определяют названия плазмид: например, F-плазида (fertility) индуцирует деление клетки, или R-плазида определяет устойчивость бактерий к антибиотикам [10].

Другими внехромосомными элементами являются профаговые элементы. Например, нуклеоид *E. coli* штамм Sakai содержит более 10% таких последовательностей — подобны фагу λ , P2 и Mu. Не лишены данных внехромосомных элементов и практически значимые микроорганизмы, как например молочнокислые бактерии. Встраиваясь в ДНК бактерии, фаги вызывают их лизогенизацию, и бактерии могут приобретать новые характерные признаки:

1. Приобретение генов, от предыдущих хозяев фага;
2. Экспрессия «молчащих» генов бактерий. ДНК фага заменяет поврежденный промотор, который ранее был неактивен. При этом синтезируются определенные продукты, например протоксины дифтерийных бактерий.

Из-за своего разрушающего действия на микроорганизмы фаги могут быть применены с лечебно-профилактической целью при многих заболеваниях (холера, дизентерия, различные гнойно-воспалительные заболевания и т. д.) [11].

Прокариотический геном является динамичной структурой даже в пределах одного вида. Исходя из этого сложились представления о основной и дополнительной группе генов. Консервативная основная группа состоит из генов «домашнего хозяйства», необходимые для поддержания жизни в

клетке (с помощью обеспечения матричных биосинтезов, основных метаболических путей и образования скелеточных структур, определяющих принадлежность к виду. В разряд дополнительных включают “гены роскоши”, они экспрессируются непостоянно и ответственны за приспособление к определенным экологическим условиям. Большинство дополнительных генов находятся во плаزمиде, которые могут присутствовать не во всех штаммах одного вида [12].

Нуклеоид бактерий содержит до 4000 генов. Длина его у различных видов царства *Procarvota* варьируют от 3×10^8 до 3×10^9 Д [13].

1. 3 Ген 16S рРНК

Наиболее удобным геном для идентификации микроорганизмов оказался ген, в котором зашифрована 16S рРНК [14]. Он присутствует во всех известных бактериях, но отсутствует у вирусов и в клеточном ядре эукариот (у эукариот присутствует в ДНК митохондрий). Этот ген имеет как консервативные участки, так и видоспецифичные [**Error! Reference source not found.**]. Консервативные участки необходимы для подбора универсальных затравок для амплификации фрагментов гена различной длины, а видоспецифичные — необходимы для идентификации микроорганизма. Степень схожести видоспецифичных участков доказывает эволюционное родство многих различных видов, ранее считавшиеся неблизкородственными.

Нуклеотидные последовательности 16S рРНК многих известных бактерий и архей находятся в открытом доступе. Выявленные последовательности изучаемых микроорганизмов можно сравнить с присутствующими в базах данных и идентифицировать вид бактерии. В последнее время старая, фенотипическая классификация бактерий становится не актуальной, ведь сравниваются плохо формализуемые критерии (цвет

колоний, её блеск, профиль и т.д.). Современная систематика основана на молекулярных признаках (нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК) и только частично повторяет фенотипическую.

Сегодня на основе анализа гена 16S рРНК ведутся активные исследования микробных ассоциаций рта, желудка, кишечника, желчных камней и пр. **[Error! Reference source not found.]**.

1. 4 Бактерии-антагонисты грибов

Бактерии и грибы являются двумя основными группами растительного микробиома. Их взаимодействия имеют решающее значение для формирования микробных сообществ окружающей среды и оказывают важное влияние на приспособленность, колонизацию или патогенез взаимодействующих партнеров. Взаимодействия и коммуникации между бактериями и грибами могут быть достигнуты с помощью совершенно различных механизмов, что приводит к многочисленным биологическим эффектам, которые варьируются от антагонизма до кооперации [17].

Антагонизм — тип несимбиотических взаимоотношений, при котором один вид (штамм) полностью подавляет или замедляет рост другого вида (штамма) [18]. Обычно данный тип взаимоотношений возникает при синтезе и секреции одним микроорганизмом определенных химических веществ, подавляющих рост и жизнедеятельность других патогенных микроорганизмов [19].

Подобный вид взаимоотношений широко распространён в почвенном грунте, где происходит вечная борьба за место и необходимые для выживания питательные вещества **[Error! Bookmark not defined.]**, и особое значение это имеет для ризосферных и эндофитных микроорганизмов.

1. 5 Сравнительная характеристика ризосферных и эндофитных бактерий

Ризосферные бактерии — это бактерии, проживающие в ризосфере, т.е. в той части почвы, которая расположена непосредственно рядом с корневой системой растения [20]. Эндофиты — это микроорганизмы, которые обитают непосредственно в внутренних тканях растений без возникновения негативного воздействия на хозяина [**Error! Bookmark not defined.**]. Конечно, бактерии, обитающие в ризосфере, могут также иметь потенциал для проникновения и колонизации корней растений. Фактически, эндофитное бактериальное общество можно рассматривать как подмножество ризосферных бактерий [**Error! Bookmark not defined.**].

Среда ризосферы чрезвычайно конкурентоспособна, и бактерии должны в ней выживать. Микрофлора ризосферы, вероятно, будет производить более богатый арсенал антибиотиков. Напротив, облигатные эндофитные бактерии сталкиваются с гораздо меньшей конкуренцией, что отражается в менее богатом метаболитами арсенале, но они могут продуцировать другие специфические метаболиты, поддерживающие или необходимые для взаимодействия с хозяином. Тем не менее, многие эндофитные бактерии являются факультативными колонизаторами растений и должны хорошо конкурировать в ризосфере перед попаданием в растение, и поэтому могут быть оснащены богатым арсеналом метаболитов, участвующих как в защите, так и во взаимодействии с растением [21].

Как ризосферные бактерии, так и эндофиты могут способствовать росту растений в сельском хозяйстве, садоводстве и лесоводстве, а также экологической очистке (фиторемедиации). Но бактериальные эндофиты могут предложить несколько преимуществ хозяину, чем ризосферные бактерии, так как жизнь в тканях растения дает возможность всегда находиться в «контакте» с клетками растения и, следовательно, с большей

готовностью оказывать прямое полезное воздействие [22]. В различных условиях окружающей среды бактериальные эндофиты взаимодействуют с растением более эффективно [23].

Однако неясно, является ли пребывание в растительных тканях преимуществом для бактериальных эндофитов, по сравнению со свободной жизнью в ризосфере.

1. 6 Биоразнообразие бактериальных эндофитов

Эндофиты способны колонизироваться во всех типах тканей растений и были обнаружены почти во всех растениях по всему миру [**Error! Bookmark not defined.**]. В многих растениях могут встречаться целые сообщества эндофитов [**Error! Bookmark not defined.**]. Растение, не содержащее эндофитов, является редким исключением того, что обычно встречается в природе.

Последние оценки показывают, что планета содержит около 300 тысяч видов растений, подавляющее большинство из которых содержат эндофиты. Фактически, микробные эндофиты были обнаружены у всех видов растений, которые были проанализированы. Растение без эндофитов было бы менее способно справляться с патогенами и более подвержено воздействию внешних стрессовых состояний [**Error! Bookmark not defined.**].

Эндофитные сообщества растений состояли в основном из пяти филумов, причем наиболее распространенным был филум *Proteobacteria* (90%). Причем 98% бактерий, относящихся к данному филуму, состояли из порядков *Enterobacteriales*, *Pseudomonadales*, *Xanthomonadales*, *Rhizobiales*, *Sphingomonadales*, *Burkholderiales*, *Actinomycetales* и *Flavobacteriales*. Другие обнаруженные филумы были *Actinobacteria* (1.5%), *Planctomycetes* (1.4%), *Verrucomicrobia* (1.1%) и *Acidobacteria* (0.5%).

Наиболее часто встречающимися родами бактериальных эндофитов являются *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium*, *Pantoea*, *Microbacterium* [24,25]. Все эти роды, описанные как бактериальные эндофиты, также являются обычными обитателями ризосферы.

Также было проведено сравнительно немного исследований, в которых проанализированы эффекты различных переменных среды на разнообразие эндофитов. Популяция эндофитов растений зависит от многих переменных, таких как стадия роста растений, сезонные воздействия, анализируемая растительная ткань; здоровье растения; состояние питания растения [**Error! Bookmark not defined.**]; тип почвы [26] и ее состояние (включая pH и содержание влаги); высота ; температура и т. д.

Поэтому необходимо проводить широкие методы скрининга для того, чтобы иметь более глубокое понимание ассоциаций между различными типами эндофитов, обнаруженными на одном растении что, вероятно, расширит понимание экологической роли микроорганизма внутри растения. Такая база знаний важна для будущей разработки более эффективных агентов биологического контроля и агентов, способствующих росту растений. В связи с этим было бы полезно определить эндофитную микробиому на агрономически важных растениях.

Другой, не менее важной задачей является исследование биологически активных соединений, синтезируемых эндофитами. Это имеет важное значение для медицинского сообщества, поскольку данные соединения могут являться потенциальными лекарственными средствами, обладающие низкой токсичностью для клеток человека [27].

1. 7 Механизмы, используемые бактериями, для подавления жизнедеятельности грибов

Эндوفитные бактерии могут влиять на рост растений прямо или косвенно. Прямое поощрение роста растений происходит, когда-либо эндوفиты облегчают получение питательных веществ из окружающей среды; либо модулируют рост растений путем обеспечения или регулирования различных растительных гормонов, включая ауксин, цитокинин или этилен.

Косвенное продвижение роста растений происходит, когда бактерия ограничивает или предотвращает повреждение растений, вызванные различными патогенными агентами **[Error! Bookmark not defined.]**.

Существует большое количество общих механизмов, которые бактерии используют для подавления жизнедеятельности грибов **[Error! Bookmark not defined.]**.

Первый из них, индуцированная системная резистентность (ИСА) растений. Это резистентность, передающаяся по наследству (генотипическая), основанная на увеличении экспрессии ряда генов, развивающих защитные механизмы против патогенеза **[Error! Bookmark not defined.]**.

Вещества, запускающие ИСА, называются элиситоры. Они могут быть вещества различной природы, но связанных с клеточной стенкой [28]. Они включают каскад химических реакций, включая образование активных форм кислорода (АФК), активирования белков при помощи добавления остатка фосфорной кислоты, инициация основных реакций фитоиммунитета, приводящие к развитию ИСА. Одним из примеров элиситоров являются белки, связанные с патогенезом, — PR-белки. Они образуют АФК, высвобождение которых называют «кислородный взрыв» [29].

Второй механизм — это продукция антибиотиков. Существует несколько наиболее распространенных антибиотиков, продуцируемых эндوفитами.

Наиболее активным из них является такой липопептид, как сурфактин [30,31]. Липопептиды представляют собой циклические низкомолекулярные соединения, обычно продуцируемые *Bacillus* и *Pseudomonas sp.* Они в основном состоят из гидрофильной головки из 7–10 аминокислот, связанной с хвостом гидрофобной жирной кислоты [Error! Bookmark not defined.]. Циклический липопептид сурфактин содержит карбоновую кислоту (3-гидрокси-13-метилтетрадекановая кислота) и семь аминокислот [32]. Структура характеризуется наличием гептапептида, соединенного с жирной β -гидроксикислотой через сложноэфирную связь [33].

Липопептиды большинства диких штаммов способны формировать биопленку на протодерме корня растений. Сурфактин — один из основных поверхностно-активных веществ, индуктор развития биопленки. Биопленка способствует колонизации корней микроорганизмами и тем самым увеличивая локальную концентрацию антибиотиков [Error! Bookmark not defined.].

Липопептиды, продуцируемые бактерией, взаимодействуют с цитоплазматической мембраной гриба, вызывая образование пор [34]. Схожим образом действуют лантобиотики.

Лантобиотики — рибосомально синтезируемые пептидные антибиотики, содержащие лантионин. Лантобиотики, синтезируемые грамположительными кокками, ингибирует синтез муреина и укорачивает его молекулу, инициируя формирование пор [35]. Наиболее распространенный лантобиотик - субтилиин. Это 32-аминокислотный пентациклический антибиотик, структурно связанный с низином (*Lactococcus lactis*), который широко используется в биозащите.

Существуют и антибиотики, действующие по другому типу механизма. Ризоктицин А — фосфатсодержащий олигопептидный антибиотик, синтезируемый грамположительной бактерией *B. subtilis*. Это вещество, состоящее из двух-трех аминокислот, обычно из аргинина и L-2-амино-5-

фосфорно-3-пентенойковой небелковой аминокислоты. Оно проникает в грибную клетку через пермеазную систему переноса. В результате пермеаза освобождает небелковую фосфатсодержащую аминокислоту, которая подавляет биосинтез белка. Фосфонатные соединения распространены среди БАВ, главным образом, из-за их влияния на активные метаболиты множества сигнальных путей [**Error! Bookmark not defined.**].

Третий механизм подавления жизнедеятельности грибов, это продукция летучих органических соединений (ЛОС). ЛОС индуцирует утолщение клеточной стенки, везикуляцию протоплазмы и блокирование ветвления гиф грибов. Существуют штаммы, синтезирующие более 70 летучих органических соединений [36].

Четвертый механизм, это гипоацетилирование гистонов. Соединение, секретируемое бактериями (феназин-1-карбоксамид), напрямую влияет на активность грибкового белка FgGcn5, являющегося гистонацетилтрансферазой. Это приводит к дерегуляции ацетилирования гистонов в H2BK11, H3K14, H3K18 и H3K27 в *Fusarium graminearum*. Гипоацетилирование приводит к подавлению роста грибов, снижению вирулентности и биосинтеза микотоксинов [**Error! Bookmark not defined.**].

Можно с уверенностью сказать, что существует ещё огромное множество других механизмов, которые требуют дальнейшего изучения.

1. 8 Выделение ДНК лизисным методом

Выделение нуклеиновых кислот — важный этап подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами. Большинство биохимических процессов, таких как амплификация, проведение обратной транскрипции, секвенирование, гибридизация, синтез ДНК, не могут быть выполнены непосредственно на исследуемых образцах без предварительного получения и очистки НК.

Существует несколько общеизвестных методов получения ДНК из биологического материала, и в зависимости от поставленной задачи 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 [37].

Выделение бактериальной геномной ДНК лизисным методом основывается на эффективном выходе ДНК посредством специального лизисного буфера G-A. После этого быстрое отделение геномной ДНК от белков, полисахаридов и липидов достигается с помощью фазо-разделяющего шага. Высоко очищенная ДНК в нижней фазе связывается с колонкой. Затем промывают буфером W1 и W2 чтобы удалить остаточные вещества и соли, очищенная ДНК элюируется с колонки в трис-буфер или воду. Выделенная таким образом ДНК подходит для большого количества реакций включая ПЦР и многие другие реакции.

1. 9 Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод молекулярной биологии, необходимый для значительного увеличения числа копий определённых фрагментов ДНК в исследуемом материале [38]. Этот метод был изобретен биохимиком Кэри Муллисом (США) в 1983 году [39], за разработанный метод он получил Нобелевскую премию в 1993 году.

Помимо амплификации (увеличения концентрации ДНК), при помощи ПЦР можно проводить множество различных действий с НК (введение полиморфизмов или мутаций, сшивка различных фрагментов ДНК). Амплификация активно применяется в молекулярной биологии и медицине, например, для установления причины заболеваний (наследственных, инфекционных); подтверждения материнства или отцовства; клонирования

ДНК, и выявления новых генов [40, 41]. Также этот метод очень эффективен для изучения полиморфизма ДНК.

В основе метода ПЦР лежит процесс репликации - комплементарного достраивания ДНК матрицы, осуществляемое с помощью энзима ДНК-полимеразы.

Для проведения ПЦР требуются следующие компоненты:

- **Исследуемый образец** (содержит участок, число копий которого необходимо увеличить)
- **праймеры** (короткие олигонуклеотиды, обычно имеющие длину размер от 10 до 30 п.о., идентичные исследуемым участкам генома. Без них невозможна амплификация [42]. Правильность подбора затравок обеспечивает специфичность и чувствительность тест-системы.)
- **Taq-полимераза**
- **дезоксинуклеозидтрифосфаты**(дНТФ) – дезоксиаденозин-трифосфата (dATP), дезоксигуанозин-трифосфата (dGTP), дезоксицитозин-трифосфата (dCTP) и дезокситимидин-трифосфата (dTTP) - субстраты, используемые ДНК-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.)
- **ионы Mg^{2+}** (необходимы для работы Taq-полимеразы, они образуют растворимые комплексы с дНТФ. Оптимальная концентрация Mg^{2+} находится в диапазоне 1-5мМ.)
- **буферный раствор** (включает в себя смесь анионов и катионов в определенной концентрации и стабильное значение pH) [43]

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

1. Денатурация

Происходит нагрев до 94—96° С двойной цепи ДНК в течение 0,5—2 мин., чтобы произошло разрушение водородных связей между двумя цепями.

2. Отжиг

Затем температуру снижают, чтобы затравки могли соединиться с одноцепочечной ДНК-матрицей. Температура отжига зависит от нуклеотидного состава затравок и зависит от их температуры плавления (на 3—5° С ниже). Время стадии— 0,5—2 мин [44].

3. Элонгация

На этой стадии Taq-полимераза реплицирует антисмысловую цепь. Она начинает рост этой цепи от 3'-конца затравки, который связался с ДНК-матрицей, и движется вдоль неё по направлению от 5'-конца к 3'-концу.

По завершению всех основных стадий нередко применяется дополнительная элонгация, чтобы достроить все незавершенные фрагменты. Эта стадия длится обычно 7-10 мин.

ПЦР проводят в амплификаторе или термоциклере — устройстве, обеспечивающее амплификацию с помощью изменения температуры (точность не менее 0,1° С). Ампликон — единица амплификации [45].

1. 10 Термостабильные ДНК-полимеразы

ДНК-полимераза - фермент, синтезирующий цепи нуклеотидов из нуклеозидтрифосфатов. Они добавляют нуклеотиды к 3' - ОН группе предыдущего нуклеотида в молекуле ДНК, поэтому все ферменты работают в направлении 5' --> 3'. В процессе репликации полимераз копирует исходную последовательность ДНК. Точность копирования очень высока, но всё же могут возникать в этом процессе мутации, поэтому большинство ДНК-полимераз обладают способны исправлять мутации.

Очень важная характеристика ДНК-полимераз является их термостабильность. Именно термостабильную ДНК-полимеразу впервые получили из термофильных бактерий и назвали Taq-полимераза. Она оказалась устойчивой к высокой температуре и могла выдерживать несколько циклов реакции.

Благодаря этому стало возможно упрощение и автоматизация процедуры ПЦР, ведь теперь стало возможно добавление полимеразы в реакционную смесь до стадии денатурации [46].

1. 11 Электрофорез

Электрофорез - экспериментальный метод, необходимый для разделения белков и НК по их размерам. Он широко используется для аналитических и препаративных целей [47].

Электрофоретическое разделение проводят в гелях [48]. Для молекул ДНК крупных размеров полиакриламидный гель является не удобным из-за малого размера пор, поэтому для разделения НК крупного размера создали агарозные гели (агароза – линейный полисахарид, входящий в состав агара, получаемый из красных и бурых водорослей).

Разделение НК происходит в электрофорезной камере, заполненной буферным раствором. Для этого используются трис-ацетат-ЭДТА, трис-боратные или трис-фосфатные буферные растворы. Буфер обеспечивает увеличение ионной силы раствора, необходимого для электрофореза. Он же применяется для приготовления геля.

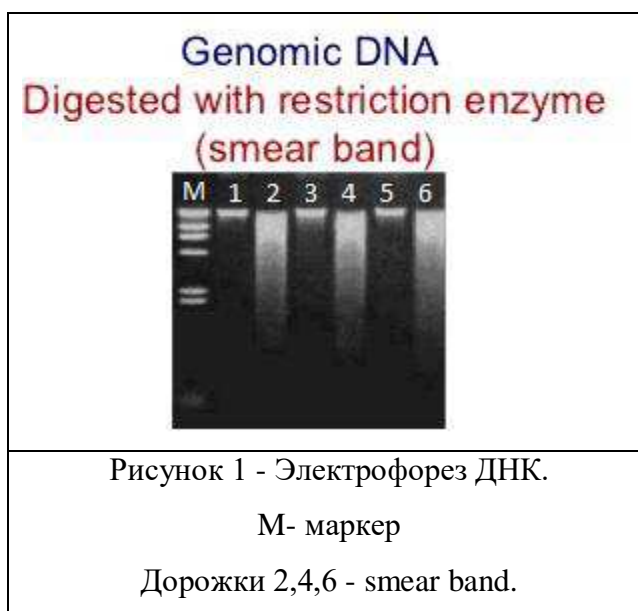
Электрофорез – классический метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью него можно эффективно и быстро разделить такие фрагменты НК, которые не разделяются иными методами. Для визуализации результатов исследуемые НК окрашивают флуоресцирующим красителем, связывающийся с НК – бромистым этидием в малой концентрации. При окрашивании бромистым этидием, в ультрафиолетовом свете, можно зафиксировать около 1 нг НК [49].

Скорость перемещения ДНК через агарозный гель при электрофоретическом разделении определяется следующими критериями:

- размером и конформацией молекул ДНК,
- концентрацией агарозы в агарозном геле,
- напряженностью электрического поля,
- типом и концентрацией используемого буферного раствора.

Электрофоретическое разделение позволяет нам определить количество и качество НК. Количество определяется лишь приблизительно, ведь она устанавливается путем сравнения интенсивности окрашивания исследуемой НК с молекулярно-генетическим маркером, концентрация которого заранее известна.

Но в большей степени электрофорез применяется именно для определения качества ДНК. При хорошем качестве образца ДНК полосы при электрофорезе будут ровные и четкие, без разводов и, так называемого, smear band (Рис.1). Также для оценки качества ДНК бывает необходимо оценить длину выделенных НК в п.о., это возможно сделать, также как и при оценке количества НК, с помощью ДНК-маркеров.



1. 12 Методы идентификации бактерий

Идентификация означает определение принадлежности изучаемого организма к тому или иному таксону. Критерием для определения является наличие у микроорганизма группы основных признаков, специфичных для данного вида (таксонометрических признаков). Задачам ускорения, упрощения и удешевления идентификации культур служат широко распространенные в настоящее время молекулярно-генетических методов [50]. При идентификации культур проводят определение их родовой и видовой принадлежности, а при необходимости и внутривидовое.

К основным молекулярным подходам, нацеленным на ген 16S рРНК, можно отнести следующие методы: RFLP – полиморфизм рестриционных фрагментов; FISH - флуоресцентная гибридизация *in situ*; Q-PCR - количественная полимеразная цепная реакция; секвенирование [51].

1. 13 FISH метод

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) необходима для определения и подсчета единичных клеток бактерий, а также их сообществ. FISH основан на том, что ДНК-мишени взаимодействуют с флуоресцентно-мечеными короткоцепочечными зондами, комплементарными определенным участкам НК, после чего визуализация результатов происходит с помощью флуоресцентного микроскопа. Зонды бывают универсальные (гибридирующие со всеми видами бактерий, это может быть необходимо для подсчета количества микробов на единицу объема) и специфические (гибридирующие с определенными видами бактерий). Однако, поскольку обычные флуоресцентные микроскопы имеют только ограниченный набор фильтров, а оптического оборудование не всегда подходит для проведения различий между близкородственными флуорофорами с одинаковыми спектрами излучения, выполнимость идентификации огромного числа различных видов затруднены. Поэтому

многие подходы FISH в микробиологии нацелены только на два или три вида.

Как и другие быстрые методы, FISH можно выполнять, не полагаясь на громоздкое и длительное традиционное культивирование, и имеет дополнительные преимущества, поскольку он визуализирует целые клетки и нацеливается на рибосомные РНК (или другие обильные структуры, такие как гены многократного копирования), что дает FISH возможность различие между жизнеспособными организмами и мертвым материалом, в отличие от ПЦР-методов. Но FISH-метод не идентифицируют бактерии до вида, а идентифицирует их лишь до более крупных таксонов [52]. К недостаткам данного метода можно причислить проблемы, связанные с исследованием участков рРНК со сложными вторичными структурами, которые имеют плохую доступность для зондов. Также FISH-метод является более дорогим и медленным методом, чем ПЦР-методы.

FISH обычно используется в медицине и диагностике для быстрого и удобного выявления патогенов в крови или фекалиях и для цитогенетических исследований для выявления хромосомных нарушений или опухолевых клеток, а также в экологии и биологии окружающей среды для изучения состава, роста и изменений комплекса микробные сообщества и биопленки [53].

1. 14 Секвенирование

Секвенирование по Сэнгеру было создано в конце XX века, и в данный момент этот метод наиболее распространен в научно-исследовательских и медицинских организациях. Но он был значительно усовершенствован. Например, в 1985 г. радиоактивную метку смогли заменить светящейся флуоресцентной [54]. Суть секвенирования по Сэнгеру заключается в использовании химически модифицированных дидезоксирибонуклеотидов,

создающих остановку в репликации при встраивании их в молекулу ДНК, так называемый “обрыв цепи”. Каждый вид дидезоксирибонуклеотида имеет свою флуоресцентную метку. Модифицированные нуклеотиды содержатся в реакционной смеси в значительно меньших количествах, чем обычные нуклеотиды. После завершения процедуры секвенирования, у нас есть раствор, содержащий полный набор синтезированных фрагментов ДНК различной длин, так как “обрыв цепи” происходит во всех возможных участках ДНК. Секвенаторы нового поколения разделяют эти фрагменты по длине, пропуская все фрагменты через тонкие капилляры, наполненные гелем. Инициация свечения фрагментов нуклеиновой кислоты происходит под действием короткого импульса лазера, что заставляет меченому нуклеотиду испускать свет на его конце. Компьютер фиксирует флуоресцирующие сигналы и идентифицирует их друг за другом, идентифицируя при это разновидности дидезоксирибонуклеотидов, составляя полную нуклеотидную картину распределения [55].

1. 15 Количественная ПЦР

Количественная ПЦР – молекулярно-биологический метод, созданный на основе классического метода ПЦР и используется для амплификации молекул ДНК, а также для единовременного подсчета количества амплифицированных молекул ДНК. Подсчеты количества НК в режиме реального времени происходит после каждого цикла ПЦР. Для определения числа молекул ДНК используют флуоресцентные зонды или красители [56]. В остальном метод количественной ПЦР схож с классической ПЦР. Стадии в количественной ПЦР такие же, и проходят они при тех же температурных условиях. Свечение увеличивается в каждом цикле. Таким образом, график ее увеличения показывает нам изначальную концентрацию исследуемой молекулы ДНК. Вначале свечение небольшое, так как ампликонов еще мало,

поэтому ее трудно отличить от фоновой флуоресценции. По мере возрастания количества ампликонов, величина свечения растет по экспоненте, а затем выходит на плато. Выход на плато объясняется нехваткой нужного компонента ПЦР — затравок, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, флуоресцентных зондов. Если продукта реакции накопилось слишком много, то выход на плато возможен из-за фермента. Выход на плато и достижение одного уровня флуоресценции обязательно при стандартных условиях амплификации. Поэтому конечная точка не несет информации о начальном количестве исследуемой ДНК. Но когда график растет по экспоненте возможно выявить отличия в скорости продукции. Различия в начальном количестве молекул влияют на количество циклов ПЦР, необходимых для поднятия уровня флуоресценции выше фоновой флуоресценции [52].

1. 16 Рестриктивный анализ ДНК

Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы — группа энзимов, относящихся к классу гидролаз. Они катализируют гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных молекул ДНК в бактериях и в некоторых других организмах, выполняя тем самым защитную функцию. Это ферменты, определяющие специфические последовательности (сайты рестрикции) в молекуле ДНК. Рестриктазы выделяют обычно из бактерий.

В отличие от экзонуклеаз, рестриктазы гидролизуют НК в центральной части молекулы, а не на её концах. При этом каждая рестриктаза узнаёт сайт рестрикции ДНК длиной от 4 п.о. и гидролизует цепь ДНК внутри него или вне.

Рестриктазы гидролизуют молекулы ДНК очень большого размера на набор фрагментов длиной от нескольких сотен до нескольких тысяч п.о. С помощью метода электрофоретического разделения фрагменты ДНК,

различающиеся по размеру, можно легко разделить, а затем исследовать каждый фрагмент отдельно.

Короткие фрагменты ДНК мигрируют в агарозном геле намного быстрее, чем длинные. При перемещении фрагменты не разрушаются, их можно выделять в виде биологически активных двуцепочечных молекул. При окрашивании бромистым этидием проявляется набор полос, каждая полоса отвечает рестриktionному фрагменту определенной длины [57].

1. 17 Метод полиморфизма длин рестриktionных фрагментов

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

RFLP — это способ исследования геномной ДНК, путем гидролиза ДНК с помощью рестриктаз.

Полиморфизм ДНК в данном случае — это наличие вариабельности в последовательности нуклеотидов в одном и том же гене (выполняющем те же функции) у близкородственных видов. Он возможен из-за точковых мутаций в форме единичных нуклеотидных замен; инсерций (вставки); крупных делеций (выпадение нуклеотидов); транслокаций или транспозиций мобильных генетических элементов и т. п. Все флуктуации в первичной структуре ДНК ведут к изменениям в длине фрагментов, образованных в результате реакции рестрикции.

RFLP был создан как дешевый метод для массового применения. Ведь секвенирование ДНК является относительно дорогим методом, ведь часто есть необходимость только для выявления точечной мутации. Метод RFLP является одним из главных инструментов в составлении генетических карт, определении наличия генов, ответственных за предрасположенность к различным заболеваниям, их месторасположения, родства различных организмов. Полное совпадение рестрикционных картин по нескольким рестриктазам указывает на близкородственность исследуемых штаммов [58].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Используемые образцы биомассы почвенных бактерий

Идентифицируемые образцы бактерий - антагонистов грибов были любезно предоставлены магистрантом кафедры биотехнологии СФУ О. Кондратенко.

2.2 Методика выделения ДНК

Выделение бактериальной геномной ДНК проводила с использованием набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit производства компании Axygen (производства КНР).

Максимальный выход бактериальной ДНК достигался с помощью суспендирования биомассы бактерий в специальном лизисном буфере G-A (идет в наборе).

С помощью фазоразделительного шага (добавление смеси, состоящей из изопропанола и изобутанола) происходило отделение геномной ДНК от ненужных веществ, например: протеины, полисахариды и липиды. Очищенная геномная ДНК находилась в нижней фазе, верхняя фаза - органика; средняя - разрушенные клетки и денатурированные белки.

Раствор ДНК пропускался через фильтр, на котором оседают крупные фрагменты клеточного лизата.

Затем раствор ДНК наносился на специальную колонку, где происходило связывание ДНК с силикатной мембраной. Необходимый шаг – центрифугирование: один раз после добавления промывочного буфера W1 и два раза после добавления буфера W2, содержащего этиловый спирт. Центрифугирование шло 2 минуты при 12000 оборотах. Центрифугирование помогало избавиться от нежелательных соединений, случайно попавших в раствор.

Очищенную бактериальную ДНК смывала с колонки элюентом или дистиллированной водой [59].

2.3 Методика проведения электрофореза

Необходимое оборудование для проведения электрофореза

1. Источник питания Bio-Rad PowerPac HV (1-400 Вт, 0,01-500 мА, 20-5000 В)
2. Камера для горизонтального гель-электрофореза (размер геля - 70x100 мм) Mini-SubCell GT, Bio-Rad.
3. Гель-документирующая система Bio-Rad GelDoc XR с ПК.

Ход работы:

1. Добавила порошок агарозы (0,75 г) в электрофорезный буфер (объем буфера - 50 мл).
2. Нагрела взвесь в СВЧ-печи до тех пор, пока агароза не образует равномерную смесь. Смесь нагревала до начала точки кипения, затем аккуратно извлекла из СВЧ-печи и охладила до 70⁰ С.
3. Залила полученную смесь в форму для геля.
4. Установила гребенку в форму для геля. Необходимо, чтобы между основанием лунки от установленной гребенки и основанием геля оставался слой смеси толщиной 0,4-1,0 мм.
5. После того как смесь полностью затвердела (через 20-30 мин.), удалила гребенку и поместила гель в электрофорезную камеру.
6. Добавила достаточное количество электрофорезного буфера.
7. Смешала пробы ДНК с буфером для нанесения, содержащим глицерин и красители (бромфеноловый) в соотношении 5:1.
8. С помощью автоматической микропипетки внесла смесь в лунки геля под электрофорезный буфер.

9. Подсоединила электроды к источнику напряжения. Напряженность при проведении электрофореза в агарозных гелях составляет 50 V. ДНК перемещается к аноду. Бромфеноловый синий мигрирует со скоростью равной скорости фрагмента ДНК из 900 п. о.

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

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

12. Рассмотрела гель в проходящем УФ-свете. Зарегистрировала полученное изображение, используя гель-документирующую систему.

2.4 Методика проведения ПЦР

Реакция ПЦР проводилась в приборе ThermalCycler C1000.

На одну пробу объемом 50мкл требуется:

- 27 мкл дист. воды
- 5 мкл 10x буфера
- 5 мкл + 5 мкл праймеров с концентрациями по 1μM (500F - 1350R; 8F – 1492R)
- 3 мкл MgCl₂с концентрацией 2.5mM

Все вещества смешивали в 1 пробирке объемом 1,5 мл из расчета на 15 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.

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 и 1500 пар оснований.

Используемая программа при проведении ПЦР:

1. 94⁰C – 3:00 мин.
2. 80⁰C – 0:40 сек
3. 95⁰C – 0:10 сек.
4. 62⁰C – 0:20 сек.
5. 72⁰C – 1:40 мин. (1:00 мин. для ампликонов длиной 1350F - 500 L)
6. Go to 3:35 times
7. 72⁰C for 10: 00 мин.
8. 4⁰C – 18:00:00

2.5 Проведение реакции рестрикции

Перед проведением рестрикционного анализа ампликоны были очищены с помощью набора Diatom DNA PCR Clean-UP. Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 2 ч. в приборе Thermomixer comfort производство фирмы Eppendorf. Реакция проходила при 37 °C (для эндонуклеаз рестрикции Rsa I, Bsn I); 50⁰C (для эндонуклеазы рестрикции BstHI I); 55⁰C (для эндонуклеазы рестрикции Sse9 I); 65 °C (для эндонуклеазы рестрикции Ttu1 I) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 ед. акт. рестриктазы.

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

- 5 мкл 10x буфера
- 10 мкл разб. BSA

- 25 мкл H₂O
- 10 мкл ДНК
- 5 мкл фермента (активность фермента 10 000 е.а/мл)

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

Для визуализации результатов рестрикции использовали гель-электрофорез. Сайт узнавания всех рестриктаз, с которыми мы работали, состоит из 4 нуклеотидов (Табл. 1), что позволило получить от 3 до 7 фрагментов ДНК в результате рестриктирования, имеющих длины порядка 900 пар нуклеотидов и 1500 пар нуклеотидов [60].

Таблица 1 - Характеристика рестриктаз Rsa I, Tru1 I, Bsn I, Sse9 I и BstНН I.

Название рестриктаза	Сайт узнавания	Температура	Инактивация (20 минут, 65°)	Инактивация (20 минут, 80°)
Rsa I	GT [^] AC CA [^] TG	37	Нет	Нет
Tru1 I	T [^] TAA AAT [^] T	65	Нет	Да
Bsn I	GG [^] CC CC [^] GG	37	Нет	Да
Sse9 I	[^] AATT TTAA [^]	55	Да	Да
BstНН I	GCG [^] C C [^] GCG	50	Нет	Нет

2.6 Методика анализа *in silico*

In silico – термин, обозначающий компьютерное моделирование эксперимента, чаще биологического.

С помощью компьютерного моделирования анализируют нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности, производят выравнивание последовательностей, поиск гомологичных последовательностей ДНК, РНК и белков, построение филогенетических карт, используя специальное программное обеспечение. Осуществляют такие методы как: теоретические амплификацию, рестриктирование, электрофорез. Данный метод позволяет анализировать различные геномы, имеющие длину до нескольких миллиардов пар нуклеотидов, за короткое время, осуществлять поиск нужных последовательностей ДНК, РНК, белков и работать с ними [61].

Был проведен рестрикционный анализ *in silico* ампликонов их генов 16S-рРНК с помощью программы pDRAW32. После теоретического рестриктирования ампликонов 500F-1350R и 8F-1492R, взятых из базы данных GenBank [62] для каждого вида были построены рестрикционные профили.

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты, с 36 по 52 страницу, результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Был проведен анализ ПДРФ *in silico* ампликонов 500F-1350R и 8F-1492R гена 16S-рРНК бактерий - антагонистов грибов с использованием данных GenBank для рестриктаз Rsa I, Tru1 I, Bsn I, Sse9 I, BstНН I. и построены теоретические электрофореграммы.

Из образцов бактерий - антагонистов грибов была извлечена ДНК хорошего качества.

Используя полученные образцы ДНК, были получены ампликоны 500F-1350R и 8F-1492R гена 16S рРНК исследуемых бактерий и проанализированы методом анализа ПДРФ.

Проведя сравнительный анализ теоретических и экспериментальных данных, мы получили, что: образцы 3, 10 это *Bacillus cereus*, образцы 4, 8 это *Bacillus pumilus*, образцы 2, 13, 14 представители *Bacillus amyloliquefaciens*, образцы 1, 15 представители *Bacillus thuringiensis*, образцы 5, 17 - *Rhizobium radiobacter*, образцы 6, 16 - *Achromobacter xylosoxidans*, образец 11, 18 - *Pseudomonas fluorescens*, образец 9 - *Arthrobacter globiformis*, образцы 7, 12 - *Roseovarius tolerans*.

Оказалось, что рестриктаза Tru1 I является самой подходящей для выявления бактерий-антагонистов грибов при условии использования ампликонов размером примерно 1500 п.о. Если исследовать рестрикционные профили ампликонов меньшего размера (около 900 п.о.), то наиболее подходящим будет использование рестриктазы Bst НН1. Но при её использовании сложно различить *Achromobacter xylosoxidans* и *Pseudomonas fluorescens*, так как они имеют похожие картины рестрикции. Когда данные картины рестрикции расположены рядом, то различия очень заметны. При отдельном же рассмотрении каждой из этих картин рестрикции возможна ошибочная идентификация. Поэтому использование рестриктазы Tru1 I и ампликонов 8F-1492R (размером около 1500 п.о.) будет более подходящим.

Применение рестриктазы Sse 9 I позволяет выявить очень быстро вид *Rhizobium radiobacter* бактерий-антагонистов грибов.

В свою очередь, применение рестриктаз Rsa I и Bsn I не позволяет выявить определенный вид бактерий рода *Bacillus*, а только выявляет две группы бактерий. И также при использовании рестриктазы Rsa I выявляется похожая картина распределения рестриктов для бактерий *Arthrobacter globiformis*, *Achromobacter xylosoxidans* и *Roseovarius tolerans*. Если есть необходимость, только в идентификации рода бактерий, то наиболее выгодным будет использование рестриктазы Bsn I, а не Rsa I.

Наши исследования свидетельствуют о том, что метод анализа ПДРФ гена 16S рРНК при условии соответствующего подбора эндонуклеаз рестрикции, может служить удобным подспорьем для определения вида микроорганизмов в дополнении к традиционным методам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ – биологически активные вещества

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дАТФ – дезоксиаденозин трифосфат

дГТФ – дезоксигуанозин трифосфат

дТТФ – дезокситимидин трифосфат

дЦТФ – дезоксицитидин трифосфат

АФК – активные формы кислорода

ИСА – индуцированная системная резистентность

ЛОС – летучие органические соединения

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

п.о. – пары оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

bp – base pairs

BSA – бычий сывороточный альбумин

dNTPs – дезоксинуклеозид трифосфаты

E. coli – *Escherichia coli*

ARDRA – Amplified rDNA Restriction Analysis

FISH – fluorescence *in situ* hybridization

RFLP – restriction fragment length polymorphism

SUMMARY

Nowadays it is more reliable to use genetic identification of different bacteria rather than physiological or morphological characteristics because in some cases they could be ambiguous. There are two types of genetic identification: sequencing and Restriction Fragment Length Polymorphism analysis (RFLP analysis). Lots of methods are based on using gene 16S rRNA. In this work nucleotide sequences within that gene were studied in order to identify some samples of bacteria.

A high-quality DNA from 15-samples of studied bacteria was obtained in this work. Then two types of amplicons were obtained by using PCR and a set of primers (8F – 1492R; 500F – 1350R). That amplicons were subjected to restriction analysis with five restriction endonucleases. According to the work studied samples were identified as follows:

- Samples 1 и 15 - *Bacillus thuringiensis*;
- Samples 2, 13 и 14 - *Bacillus amyloliquefaciens*;
- Samples 3 и 10 - *Bacillus cereus*;
- Samples 4 и 8 - *Bacillus pumilus*;
- Sample 5, 17 - *Rhizobium radiobacter*;
- Samples 6 и 16 - *Achromobacter xylosoxidans*;
- Samples 7 и 12 - *Roseovarius tolerans*;
- Sample 9 - *Arthrobacter globiformis*;
- Samples 11 и 18 - *Pseudomonas fluorescens*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1. Панчин, А. Ю. Сумма биотехнологии / А. Ю. Панчин. – Москва: АСТ, 2015. – 432 с.
2. Николаев, А. Я. Биологическая химия: учебное пособие / А. Я. Николаев. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2007. – 589 с.
3. Dahm, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA / R. Dahm // *Developmental Biology*. – 2005. – № 2. – P. 276.
4. Cremer, T. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells / T. Cremer, C. Cremer // *Nat Rev Genet*. – 2001. – № 2. – P. 292–301.
5. Pal, C. An integrated view of protein evolution / C. Pal, B. Papp, M. Lercher // *Nat Rev Genet*. – 2006. – № 7. – P. 337–348.
6. Патрушев, Л. И. Экспрессия генов: монография / Л. И. Патрушев. – Москва: Наука, 2000. – 830 с.
7. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева – Москва : Изд-во МГУ, 2004. – 448 с.
8. Попова, Н. А. Введение в биологию : учебное пособие / Н. А. Попова. – Новосибирск: НГУ, 2012. – 270 с.
9. Нетрусов, А. И. Микробиология: учебное пособие / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова – Москва: Академия, 2006. – 352 с.
10. Квитко, К. В. Генетика микроорганизмов: учебное пособие / К. В. Квитко, И. А. Захаров. – Санкт Петербург: Изд. дом СПб. ун-та, 2012. – 268 с.
11. Кушкина, А. И. Лизогения у бактерий и её значение для биотехнологии / А. И. Кушкина, Ф. И. Товкач. // *Биотехнология*. – 2011. – Т. 4, №1. с С. 29–40.

12. 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.
13. Нуклеоид [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://micro sight.ssmu.ru/morfologiya-mm/anatomiya-bak-kletki-mm/nukleoid-mm>
14. Жимулев, И. Ф. Общая и молекулярная генетика / И. Ф. Жимулев. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2003. – 480 с.
15. Andrey, A. The Study of Viral RNA Diversity in Bird Samples Using De Novo Designed Multiplex Genus-Specific Primer Panels / A. Andrey, E. Pimkina // *Advances in Virology*. – 2018. – № 10. – С. 10–20.
16. Watanabe, N. Detection of pathogenic bacteria in the blood from sepsis patients using 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis / N. Watanabe, K. Kryukov, S. Nakagawa // *Plos One*. – 2018. – № 5. – С. 1–11.
17. Chen Y. Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation / Y. Chen [et al.] // *Nature Communications*. – 2018. – № 9. – P. 1.
18. Гиляров М. С. Антагонизм / М. С. Гиляров [и др.] // Биологический энциклопедический словарь — М.: Советская энциклопедия, 1986. — С. 28.
19. White J. F. Endophytic *Bacillus spp.* produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize / J. F. White [et al.] // *Microbiological Research*. – 2015. – № 172. – P. 79-80.
20. Феоктистова Н. В. Ризосферные бактерии / Н. В. Феоктистова [и др.] // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. — 2016. — Т. 158, № 2. — С. 207-208.
21. Brader G. Metabolic potential of endophytic bacteria / G. Brader [et al.] // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2014. – №. 27. – P. 30-37.

22. Glick B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes / B. R. Glick [et al.] // *Microbiological Research*. – 2016. – № 183. – P. 93-94.
23. Coutinho B.G. Plant-influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130 / B.G. Coutinho [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2015. – № 28. – P. 10-21.
24. Romero F.M. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum*) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing / F.M. Romero, M. Marina, F.L. Pieckenstein // *Microbiology Letters*. – 2014. – № 351. – P. 187-194.
25. Shi Y. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of *Tianshan mountain* / Y. Shi [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – 98. – P. 6375.
26. Kim B. S. Community structures and antagonistic activities of the bacteria associated with surface-sterilized pepper plants grown in different field soils / S. A. Kang, J. W. Han, B. S. Kim // *Archives of Microbiology*. – 2016. – V. 198, № 10. – P. 1027-1028.
27. Neilan A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds / A. Neilan // *Microbiological Research*. – 2014. – V. 169, № 8. – P. 483-495.
28. Yarullina L.G. Qualitative and quantitative changes of potato tuber proteome under the influence of signal molecules and infection with *Phytophthora infestans* / L.G. Yarullina [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2016, – V. 52, № 1. – P. 71-78.
29. Минаева О.М. Влияние бактериализации семян на активность оксидаз в растениях при фитопатогенной нагрузке / О.М. Минаева [и др.] // *Достижения науки и техники*. – 2015. – Т. 29, № 6. – С. 53-56.

30. Debois D. Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin / D. Debois [et al.] // *Microbiology Reviews*. – 2015. – № 10. – P. 1758-2229.
31. Cawoy H. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production / H. Cawoy [et al.] // *Molecular Plant Microbe Interactions*. – 2014. – № 27. – P. 87-100.
32. Сидорова Т.М. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов / Т. М. Сидорова, А. М. Асатурова, А. И. Хомяк // *Сельскохозяйственная биология*. – Т. 53, № 1. – 2018. – С. 29-37.
33. Farace G. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defense responses in grapevine / G. Farace [et al.] // *Molecular Plant Pathology*. – 2015. – V. 16, № 2. – P. 177-187.
34. Ferid L. Protective effect of *Bacillus amyloliquefaciens* against infections of *Citrus aurantium* seedlings by *Phoma tracheiphila* / L. Ferid [et al.] // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – V. 30, № 2. – P. 529.
35. Glick B.R. *Beneficial Plant-Bacterial Interactions* / B. R. Glick, R. Bernard. Springer, 2015. — 251 p.
36. Elvira R. Antifungal Volatile Organic Compounds from the Endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2II1a: a Qualitative Change in the Intraspecific and Interspecific Interactions with *Pythium aphanidermatum* / R. Elvira [et al.] // *Microbial Ecology*. – 2016. – V. 71, № 2. – P. 347.
37. Copeland, W. C. *Mitochondrial DNA Methods and Protocols* / W. C. Copeland // *MMB*. – 2002. – V. 197. – P. 199–212.
38. Вартапетян, А.Б. Полимеразная цепная реакция / А.Б. Вартапетян // *Молекулярная биология*. – 1991. – Т. 25. – № 4. – С. 926-933.
39. Phadke, S. *Harnessing the Power of PCR Molecular Fingerprinting Methods and Next Generation Sequencing for Understanding Structure and Function*

- in Microbial Communities / S. Phadke, A. F. Salvador // *Methods Mol Biol.* – 2017. – № 2. – С. 225-248.
40. Гусейнов, О. А. Методы биохимических исследований: учеб. метод. пособие к лаб. занятиям / О. А. Гусейнов. – Красноярск: СФУ, 2012. – 46 с.
41. Широкова, Н. В. Оптимизация техники проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования овец / Н. В. Широкова [и др.] // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – № 113. – С. 1473-1481.
42. Khosravi, H. Identification and molecular characterization of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter salinestrus* using ARDRA, REP, ERIC, and BOX / H. Khosravi, H. K. Dolatabad // *Mol Biol.* – 2020. – № 1. – С. 307–316.
43. Sourri, P. A single enzyme PCR-RFLP assay targeting V1-V3 region of 16S rRNA gene for direct identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from other *Alicyclobacillus* species / P. Sourri, A. Doulgeraki // *J Appl Genet.* – 2019. – № 5. – С. 225–229.
44. Vázquez-Marrufo, G. Multi-Typing of Enterobacteria Harboring LT and ST Enterotoxin Genes Isolated from Mexican Children / G.1. Vázquez-Marrufo, J. A. Rosales-Castillo // *Jpn J Infect Dis.* – 2017. – № 7. – С. 50–60
45. Полимеразная цепная реакция [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o_pass/ММoB/10.pdf
46. SibEnzyme [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://russia.sibenzyme.com/products/restrictases>
47. Solanki, M. Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat / M. Solanki, B. S. Kundu // *Annals of Agrarian Science.* – 2018. – № 16. – 458–463.
48. Prieto-Barajas, C. M. Effect of seasonality and physicochemical parameters on bacterial communities in two hot spring microbial mats from Araró,


- Mexico / C. M. Prieto-Barajas, R. Alfaro-Cuevas, E. Valencia-Cantero // Revista Mexicana de Biodiversidad. – 2017. – № 88. – С. 616–624
49. Гекселер, К. Аналитические и препаративные лабораторные методы / К. Гекселер, Э. Экштайн. – Москва: Химия, 1994. – 416 с.
50. Современные методы идентификации микроорганизмов: научный сборник / ННГУ; ред. Я. Хаффарессас. – Новосибирск, 2017. – С. 6-14
51. Kazumasa, F. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene / Fukuda Kazumasa, [et al.] // Journal of UOEH. – 2016. – V. 38, №3. – P. 223–232. Режим доступа: https://www.jstage.jst.go.jp/article/juoeh/38/3/38_223/_article#citedby-wrap
52. Кардымон, О. Л. Молекулярно-генетические методы для исследования микробиома кишечника / О. Л. Кардымон, А. В. Кудрявцева // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2016. – № 4. – С. 4–13.
53. Rohde, A. FISHing for bacteria in food – A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria? / A. Rohde [et al.] // Food Microbiology. – 2015. – V. 46. – P. 395-407.
54. Краснов, Я. М., Современные методы секвенирования ДНК / Я. М. Краснов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – № 2. – P. 73–79.
55. Степухович, А. Н. Анализ капиллярно-электрофоретических систем секвенирования ДНК / А. Н. Степухович [и др.] // Журнал технической физики. – 2008. – № 78. – С. 90–102.
56. Awad, W. Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens / W. Awad [et al.] // International Journal of Veterinary Science and Medicine. – 2017. – V. 5, № 2. – P. 89-97.
57. Пунина, Н. В. Изучение генетического разнообразия *Bacillus thuringiensis*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, при помощи анализа генов 16S рРНК / Н. В. Пунина, В. С.

- Зотов, А. Л. Пархоменко // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2013. Т. 5, № 1. – С. 93–103.
58. ПДРФ [Электронный ресурс] – Режим доступа:
<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/RFLP.html>
59. Выделение ДНК [электронный ресурс] – режим доступа:
<http://www.bioprotech.com.tw/databank/DataSheet/DNARNAPuri/axuprep%20bacterial%20genogen%20DNA%20miniprep%20kit.pdf>
60. Rashid, Z. Benchmark taxonomic classification of chicken gut bacteria based on 16S rRNA gene profiling in correlation with various feeding strategies / Z. Rashid, A. Ashraf // Journal of King Saud University – Science. – 2020. – № 32. – С. 1034–1041
61. Zia, Q. Current analytical methods for porcine identification in meat and meat products / Q. Zia, M. Alawami // – 2020. – № 324.
62. GenBank [Электронный ресурс]: база данных - Режим доступа:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е. И. Шишацкая

подпись инициалы, фамилия

«20» июня 2020г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Современные методы идентификации бактерий-антагонистов грибов

06.04.01 - Биология

06.04.01.05 - Реконструктивная Биоинженерия

Научный руководитель



подпись, дата

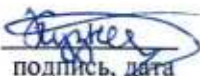
доцент, к.б.н

должность, ученая степень

О.А.Гусейнов

инициалы, фамилия

Выпускник



подпись, дата

З. В. Кузнецова

инициалы, фамилия

Рецензент



подпись, дата

доцент, к.б.н

должность, ученая степень

Л. С. Смирнова

инициалы, фамилия

Красноярск 2020