

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

« ____ » _____ 2020 г

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

«Рестрикция ампликонов 8F – 1492R гена 16S рРНК»

06.03.01 - Биология

Научный руководитель _____ доцент, к.б.н О.А.Гусейнов
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник _____ Ю.А. Бурдинская
подпись, дата инициалы, фамилия

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Рестрикция ампликонов 8F – 1492R гена 16S рРНК» содержит 48 страниц текстового документа, 45 источников использованной литературы, 2 таблицы и 12 иллюстраций.

ГЕН16S РРНК, ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММА, ЭЛЕКТРОФОРЕЗ, АНАЛИЗ АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ РИБОСОМАЛЬНОЙ ДНК, РЕСТРИКТНЫЙ АНАЛИЗ

Цель работы: Проанализировать ряд образцов бактерий рестрикцией их ампликонов гена 16S рРНК и определить их вид.

На основании поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Выделить ДНК из опытных образцов бактерий, определить концентрацию и чистоту полученных препаратов ДНК.
2. Получить ампликоны гена 16S рРНК для данных бактерий с использованием пары праймеров 8F и 1492R.
3. Провести реакции рестрикции для полученных ампликонов.
4. Провести горизонтальный гель-электрофорез полученных рестриктов с маркерами в агарозном геле.
5. Обработать полученные электрофореграммы с помощью гель-документирующей системы и путем сравнения с электрофореграммами из нашей базы данных идентифицировать микроорганизмы.

В ходе проведения биологических исследований с использованием бактерий необходимо определить принадлежность микроорганизмов к тем или иным биологическим видам. Каждый вид бактерий имеет свои особенности, поэтому необходимо точно идентифицировать их. В последнее время широкое применение находят методы определения и сравнения микроорганизмов, основанные на рестрикционном анализе амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA). В ходе работы было показано, что данный метод можно использовать для достоверного и быстрого определения видов конкретных микроорганизмов.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1 Обзор литературы.....	7
1.1 ДНК	7
1.2 Генетическая система бактерий.....	8
1.3 Система рестрикции- модификации.....	10
1.4 Ген 16S рРНК.....	11
1.5 Выделение ДНК из бактерий	12
1.6 Полимеразная цепная реакция.....	14
1.7 Электрофорез ДНК.....	16
1.8 Рестриктный анализ ДНК	17
1.9 Полиморфизм ДНК	18
1.10 Методы изучения полиморфизма ДНК	21
2 Материалы и методы.....	25
2.1 Объекты	25
2.2 Техника посева микроорганизмов на агаризованную среду.....	25
2.3 Методика выделения ДНК	26
2.4 Методика проведения ПЦР.....	28
2.5 Методика очистки ампликонов	29
2.6 Проведение реакции рестрикции.....	30
2.7 Методика проведения электрофореза	30
3 Результаты	33
3.1 Выделение ДНК из биомассы бактерии.....	33
3.2 Получение ампликонов 8F-1492R гена 16S рРНК.....	35

3.3 Сравнение теоретических электрофореграмм ампликонов гена 16S рРНК после обработки различными рестриктазами с электрофореграммами из нашей базы данных.	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	42
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	44

ВВЕДЕНИЕ

В ходе проведения биологических исследований с использованием бактерий необходимо определить принадлежность микроорганизмов к тем или иным биологическим родам и видам. Более ранние работы по принадлежности бактерий основывались на морфологических и физиологических признаках чистых культур [1]. В последнее время широкое применение находят методы определения и сравнения микроорганизмов, основанные на рестрикционном анализе амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA) [2]. ARDRA является действенным инструментом для выявления мутаций и полиморфизма различных генов путем сочетания подходящих наборов праймеров и выбора подходящей рестриктазы [3].

Анализ разнообразия длин рестрикционных фрагментов ДНК является действенным инструментом картирования генома, локализации генов, ответственных за генетические заболевания, определения риска заболевания, получения генетических отпечатков и определения родства. Рестриктивный анализ был успешно применен для ДНК-диагностики рака [4], болезни Альцгеймера [5] и муковисцидоза [6].

Цель работы:

Проанализировать ряд образцов бактерий рестрикцией их ампликонов гена 16S рРНК и определить их вид.

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 рРНК для данных бактерий с использованием пары праймеров 8F и 1492R.
3. Провести реакции рестрикции для полученных ампликонов.
4. Провести горизонтальный гель-электрофорез полученных рестриктов с маркерами в агарозном геле.

5. Обработать полученные электрофореграммы с помощью геле-документирующей системы и путем сравнения с электрофореграммами из нашей базы данных идентифицировать микроорганизмы.

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

1 Обзор литературы

1.1 ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) - макромолекула, состоящая из повторяющихся нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирными связями, и обеспечивающая хранение и передачу генетической информации. В целом структуру молекулы ДНК можно назвать «двойной спиралью». Фосфодиэфирные связи формируются в результате взаимодействия между 3'-гидроксильной группой молекулы дезоксирибозы одного нуклеотида и 5'-фосфатной группой другого [7].

Основным компонентом эукариотического ядра являются крупные линейные хромосомы. В ядерных хромосомах ДНК существует в полуупорядоченной структуре, где она оборачивается вокруг гистонов, образуя композитный материал под названием хроматин. На самом низком уровне иерархии организации хроматина ДНК оборачивается вокруг нуклеосом как структура бусы на струне. Ядро нуклеосомы состоит из около 146 п.н. ДНК, обернутых в левосторонние суперспиральные витки вокруг четырех идентичных пар белков, известных как октамер гистонов. Эти октамеры состоят из двух димеров H3 - H4 и двух H2A - H2B, а также дополнительного гистона H1, который защищает линкер межнуклеосомной ДНК. На втором уровне организации бисер на нити в свою очередь превращается в спиральную структуру диаметром 30 нм. На самом высоком уровне организации ДНК упакована в метафазную хромосому. Как показано в динамическом поведении клеточных органелл, структура хроматина значительно изменяется по мере того, как клетка проходит через клеточный цикл. Полиморфная природа структуры хроматина необходима для того, чтобы позволить использовать ДНК и управлять ею, минимизируя риск повреждения [8].

Во время биологических процессов, таких как репликация и транскрипция, ДНК раскручивается и может образовывать структуры, которые отличаются от В-формы Уотсона-Крика. Этот биологический феномен принятия различных конформаций этой изумительной биомолекулой известен как структурный полиморфизм, и он зависит от ряда факторов, таких как последовательность олигонуклеотидов, состояние раствора, гидратация, ионы, белки, лиганды и супергелистический стресс [9].

Каноническая структура ДНК, опубликованная в 1953 году Уотсоном и Криком, также называемая структурой В-ДНК, представляет собой двойную спиральную правую молекулу и является наиболее распространенной конформацией, принятой в ядре эукариотической клетки. Тем не менее, были описаны две другие структуры двойной спиральной ДНК: А-ДНК, правосторонняя, более широкая и более сжатая вдоль своей оси; и Z-ДНК, левая, более тонкая и менее сжатая конформация. Эти три формы ДНК различаются по многим параметрам, включая, среди прочего, углы, образованные парами оснований, конформацию пентозного кольца, геометрию гликозильной связи и глубину малых и главных бороздок [10]. Таким образом, можно ожидать, что конформация ДНК будет влиять на качество и количество ДНК-интеракторов, а также на процесс транскрипции. Важно отметить, что разные конформации ДНК сосуществуют в одной и той же хромосоме и даже в одном и том же гене [11].

1.2 Генетическая система бактерий

Геном бактерий состоит из нуклеоида и вненуклеоидных структур. Бактериальный нуклеоид обычно состоит из одной кольцевой двунитевой молекулы ДНК. Геном компактен, количество некодирующих последовательностей ДНК минимально, гены не несут интронов.

Подобно своим эукариотическим аналогам, бактериальные хромосомы выполняют сложную задачу эффективного уплотнения ДНК, поддерживая

регуляцию генов и правильную сегрегацию ДНК. Таким образом, хромосомы в разных масштабах формируются большим количеством белков и ферментов ДНК. В наименьшем масштабе ДНК-связывающие белки, называемые нуклеоид-ассоциированными белками (NAP), участвуют в локальном уплотнении ДНК (некоторые из них описаны как «гистоноподобные» белки) и в регуляции специфических генов [12].

Бактериальные геномы, как правило, можно рассматривать как состоящие из универсально присутствующего «ядра» генов, обеспечивающего основную генетическую информацию, которая должна сохраняться у большинства бактерий. Это включает в себя «минимальный набор», как было описано ранее. Минимальный набор генов является общим для большинства бактерий и образует основной состав фундаментального генофонда. Однако это сложно охарактеризовать, потому что это зависит от условий роста, специфичных для отдельных видов бактерий, и потому, что нет четкого определения минимальных требований и процессов существования. Геном также содержит гибкий генофонд, состоящий из «ассортимента» специфической для штамма генетической информации, которая может обеспечить дополнительные свойства, позволяющие этим видам адаптироваться к особым условиям окружающей среды. Размеры и организация бактериальных геномов значительно различаются. Наименьший и самый большой из известных на сегодняшний день геномов бактериальных патогенов - это *Mycoplasma genitalium* (580 kb) и *Pseudomonas aeruginosa* (6300kb) соответственно. Существуют значительные различия в размере генома внутри бактериальных родов и видов [13].

К вненуклеоидным структурам относятся так называемые плазмиды. Плазмиды - это генетические элементы, которые играют роль в эволюции бактерий, обеспечивая новые гены, способствующие адаптации к различным условиям [14]. Плазмиды небольшие и физически отделены от хромосомной ДНК. Они чаще всего встречаются в виде мелких кольцевых молекул ДНК у бактерий, однако, иногда присутствуют и в археях и эукариотических

организмах. Хотя нуклеоид содержит всю необходимую генетическую информацию для жизнедеятельности в стандартных условиях, плазмиды содержат дополнительные гены, которые полезны для организмов в определенных ситуациях или условиях. Плазмиды несут гены, которые обеспечивают устойчивость к природным антибиотикам в конкурентной нише окружающей среды, или продуцируют белки, действующие в качестве токсинов при сходных обстоятельствах или, позволяют организмам утилизировать определенные органические соединения, выгодные для микробов, когда общеупотребимых питательных веществ мало [15].

1.3 Система рестрикции- модификации

Метилирование ДНК является эпигенетической меткой, наиболее часто встречающейся в живом мире и влияющей на переключение генов. У бактерий оно отвечает за множество функциональных ролей, включая защиту от чужеродной ДНК, регуляцию репликации и сегрегации хромосом, восстановление несоответствия и контроль экспрессии гена вирулентности. Метилтрансферазы ДНК ответственны за перенос метильной группы от S-аденозил-1-метионина (SAM) к ДНК. Dam, Dcm и CcrM являются примерами бактериальных ДНК-МТаз, которые были всесторонне охарактеризованы по их роли в регуляции генов.

У бактерий метилирование ДНК обычно ассоциируется с системами рестрикции-модификации (R-M), которые действуют в качестве ключевых модераторов потока генетической информации между клетками путем горизонтального переноса генов (HGT). Системы R-M обычно кодируют ДНК-метилтрансферазу (МТазу), которая модифицирует определенные последовательности ДНК, и эндонуклеазу рестрикции, которая расщепляет ДНК, когда эти последовательности неметилированы [16].

Три классических типа R-M систем различаются по своей молекулярной структуре, распознаванию последовательностей, положению

расщепления и требованиям кофактора [6,101., 102., 103.]. Системы типа I представляют собой сложные гетероолигомеры, содержащие либо одну субъединицу специфичности ДНК (S), две субъединицы РНКазы и две МТазы с активностями рестрикции и модификации, либо две субъединицы Мтазы и одну S только с активностью модификации. Системы типа II, кодируемые на отдельных генах, состоят из одной гомодимерной или гомотетрамерной РНКазы и одной мономерной МТазы и в большинстве случаев способны работать отдельно и независимо друг от друга. Системы типа III представляют собой гетеротримеры или гетеротетрамеры продуктов двух генов, *res* и *mod*, участвующих в рестрикции и модификации соответственно. Обе субъединицы необходимы для рестрикции, тогда как *Mod* достаточно для создания модификации. Наконец, «системы ограничения» типа IV, в отличие от систем R-M, состоят из одной или двух REases, которые расщепляют модифицированные сайты распознавания [17].

1.4 Ген 16S рРНК

Поскольку Woese and Fox (1977) предложили рибосомную РНК в качестве филогенетического маркера в живых системах, ген 16S рРНК стал широко используемым ДНК-объектом для отслеживания видов бактерий, описания новых видов и для определения филогенетических связей между бактериями [18]. Рибосомная 16S РНК занимает особое место в изучении эволюции микробов и экологии в силу ряда необычных свойств (повсеместность, экстремальное сохранение последовательностей и доменная структура с переменными скоростями эволюции). Данные 16S генерируются с беспрецедентной скоростью благодаря новым и улучшенным технологиям секвенирования, которые значительно увеличивают пропускную способность и снижают стоимость. Сейчас ген 16S рРНК наиболее исторически важный маркерный ген [19].

Ген, кодирующий 16S рРНК, является одним из наиболее консервативных генов бактериальной рРНК и является общим для всех видов бактерий. Его длина приблизительно 1500 пар оснований в длину и состоит он из фундаментально консервативных нуклеотидных последовательностей, вкрапленных 9 вариabельными областями, которые являются специфичными для рода или вида. Генетические последовательности вариabельных областей составляют основу филогенетической классификации микробов. Путем нацеливания на консервативные области праймеров ПЦР, фланкирующих вариabельные области, можно конструировать ПЦР с широким спектром действия, способные обнаруживать нужные последовательности ДНК из любых видов бактерий. Ген 16S рРНК существует во всех бактериях, часто в нескольких копиях. Свойства гена 16S рРНК и большой объем доступной информации из базы данных делают 16S рРНК подходящим объектом для широкого молекулярного анализа [20].

Сравнение полученных последовательностей гена 16S рРНК с последовательностями NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) для этого гена широко используется для установления таксономических связей между штаммами прокариот. В соответствии с рекомендациями, предложенными для классификации бактерий, штаммы, которые демонстрируют сходство менее чем на 97% в последовательности гена 16S рРНК, представляют разные виды, а штаммы с сходством более чем на 97% в последовательности гена должны быть классифицированы как представители одного вида [15].

1.5 Выделение ДНК из бактерий

Выделение ДНК и РНК — необходимый шаг пробоподготовки перед биохимическими и диагностическими исследованиями. Многие биохимические процессы не могут быть выполнены непосредственно на

биологических образцах без предварительного выделения и очистки генетического материала.

Описаны многие методы для выделения ДНК из прокариотических клеток. Выбор метода зависит от степени чистоты ДНК, необходимой для проведения анализа. Некоторые анализы ДНК (например, те, которые используют рестрикционные ферменты) требуют ДНК высокой чистоты в относительно больших количествах. Эта ДНК может быть получена с использованием методик, которые включают этапы очистки ДНК после высвобождения из клеток. Напротив, анализы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), требуют только очень небольших количеств ДНК, качество которой может быть грубым. Простые, быстрые методы, позволяющие высвобождать ДНК из бактериальных клеток, достаточны для большинства применений ПЦР. Бактериальная ДНК может быть получена с использованием наборов для экстракции, продаваемых различными производителями. Большинство наборов используют смолы или мембраны без органической экстракции и (или) стадии осаждения спиртом для очистки ДНК [21].

В идеале в процессе экстракции ДНК удаляются ингибиторы, которые уменьшают или предотвращают амплификацию полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс экстракции также должен давать стабильный раствор, содержащий высококачественную ДНК, которая не будет разлагаться во время хранения образца. Цели процесса выделения ДНК обычно состоят в том, чтобы лизировать клетки, и таким образом высвободить молекулы ДНК, отделить молекулы ДНК от другого клеточного материала и выделить ДНК в формат, совместимый с последующими применениями, включая амплификацию. Количество и качество ДНК часто необходимо измерять, прежде чем приступить к дальнейшим аналитическим процедурам для обеспечения оптимальных результатов [22]. Рассмотрим некоторые методы выделения ДНК из бактерий на примере *E.coli*:

1. Выделение нуклеоидов методом детергент-соль или детергент-спермидин.

На первом этапе интактные клетки плазмолизуют в сахарозном буфере, содержащем лизоцим и ЭДТА, для получения чувствительных к детергенту клеток с частично переваренным слоем пептидогликана. На втором этапе клетки обрабатывают детергентами, такими дезоксихолат и / или саркозил, чтобы разрушить плазматическую мембрану и обеспечить экструзию ДНК.

2. Изоляция нуклеоидов осмотическим шоком

В методе осмотического шока клетки инкубируют в сахарозосодержащем буфере с лизоцимом и ЭДТА до тех пор, пока все клетки не превратятся в сферопласты или, в случае грамположительных клеток, в протопласты. Комплексы, высвобождаемые при осмотическом шоке, могут быть описаны как «низко-лизоцимные слабосолевые» нуклеоиды [23].

1.6 Полимеразная цепная реакция

Технология ПЦР началась с открытия первой ДНК-полимеразы примерно в 1955 году. Фермент был очищен в 1958 году, но автоматизация и современная технология ПЦР не были разработаны до 1983 года. Открытие термостабильных ферментов полимеразы произвело революцию в ПЦР, сделав возможным автоматизацию и быстрые реакции. С момента своего развития в 1960-х и 1970-х годах амплификация последовательностей нуклеиновых кислот значительно продвинула диагностическую и исследовательскую части молекулярной науки. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в настоящее время является основной частью большей части протоколов биохимического анализа. ПЦР является ферментативным синтезом и амплификацией специфических последовательностей ДНК *in vitro* [24].

Для каждого теста ПЦР необходимо присутствие фермента ДНК-полимеразы, образца ДНК, праймеров и нуклеотидов. Матрица экстрагированной ДНК представляет собой целевую последовательность-мишень, которую необходимо амплифицировать. ДНК-полимераза является ключевым ферментом для репликации последовательностей-мишеней ДНК, которая связывает отдельные нуклеотиды вместе для генерации продукта ПЦР. Молекулы праймера представляют собой короткие одноцепочечные последовательности ДНК или РНК, предназначенные для связывания с желаемой нуклеиновой кислотой-мишенью. Прямой и обратный праймеры имеют длину 18–22 пар оснований. Для ПЦР ДНК извлекают из желаемого образца и добавляют в пробирку с реакционной смесью, включающую праймеры, буфер ПЦР, дезоксинуклеотиды (dNTP), MgCl₂ и фермент ДНК-полимеразу. Реакционную пробирку затем помещают в амплификатор, который выполняет повторные циклы репликации ДНК:

1. Денатурация ДНК (нагревание реакционной трубки до 94 ° С) предназначена для разделения двухцепочечной ДНК и получения двух отдельных нитей молекулы ДНК.

2. Отжиг - при 50–65 ° С. Прямой и обратный праймеры отжигают в определенном месте на каждой из одноцепочечных ДНК-матриц. Температура плавления (T_m) пар праймеров определяет температуру отжига.

3. Элонгация - при 72 ° С. Новые комплементарные цепи ДНК синтезируются путем удлинения праймеров с использованием фермента ДНК-полимеразы [25].

Реакцию ПЦР проводят с помощью автоматических термоциклов во время каждой стадии реакции при точной температуре и в течение определенной продолжительности. Обычно процедура повторяется 30–40 раз. В конце реакционная пробирка содержит около 230 молекул предпочтительного продукта ПЦР.

Полимеразная цепная реакция и растущее число ее модификаций стали опорой в диагностической и исследовательской медицине. Методика

позволяет амплифицировать последовательности нуклеиновых кислот как в целях выявления заболеваний и патогенов, так и для приготовления зондов гибридизации и шаблонов секвенирования. ПЦР имитирует процесс репликации ДНК *in vivo* с чувствительностью, которая позволяет обнаруживать одну последовательность-мишень размером 10^{-6} генома [24].

1.7 Электрофорез ДНК

ДНК-электрофорез был одним из доминирующих методов в молекулярной биологии в течение 30 лет. ДНК-электрофорез основан на отрицательном заряде фосфатного её остова и способности распределять градиент напряжения в ситовой матрице. Проводящие свойства при электрофорезе ДНК определяются совокупностью условий, включающими напряжение, электрический ток, проводимость, температуру, а также концентрацию и идентичность присутствующих ионных частиц. Различия между существующими химическими составами для обычных проводящих сред влияют на центральные свойства [26].

Применения электрофореза ДНК включают аналитические методы, такие как картирование рестриктаз, подтверждение идентичности плазмидных вставок и продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализ последовательностей, сравнение полиморфизмов среди популяции и препаративные методы, такие как разделение фрагментов для восстановления и клонирования и количественного определения отдельных видов ДНК в смеси. Практически каждая публикация по молекулярной биологии сегодня прямо или косвенно опирается на электрофоретические методы [26].

В настоящее время электрофорез охватывает три основных платформы: электрофорез в гелевых пластинках, капиллярный электрофорез и устройства с микропроизводством. Пластинчатые гели, наиболее распространенная форма электрофореза ДНК, включают формование полимера (например,

агарозы) с проводящей средой и подачу напряжения, чтобы несколько образцов могли мигрировать параллельно. Для очень больших фрагментов ДНК используется инверсионное и двумерное расположение электрического поля в пластинчатых гелях, но оно требует специального оборудования и не полностью стандартизировано. Традиционно агарозные гели используют для разделения фрагментов двухцепочечной ДНК (например, для картирования), тогда как полиакриламидные гели используют для разделения одноцепочечной ДНК. Тем не менее, существуют серьезные ограничения; например, в агарозных гелях обычно невозможно отделить фрагменты размером более 40 килобаз, потому что они мигрируют с очень низкой скоростью. Капиллярный электрофорез использует тонкие каналы (обычно из плавленого кварца), чтобы отделить фрагменты ДНК. Геном человека был секвенирован в значительной степени благодаря изобретению капиллярного электрофореза [27]. Микрофабрикатные (микроканальные) устройства являются относительно новыми; они разделяют фрагменты ДНК после комплексной обработки аналитов [26]. За последние 10 лет миниатюризация аналитических и биоаналитических инструментов быстро развивалась. К настоящему времени были представлены различные виды систем микротомального анализа (μ TAS), которые в различной степени применялись в практическом анализе. Среди них, электрофорез в микрочипах, который рассматривается как новая технология, обещающая произвести революцию в химическом анализе из-за его выдающихся преимуществ, таких как высокая эффективность, высокая производительность, простота в эксплуатации и низкое потребление образцов и реагентов [28].

1.8 Рестриктивный анализ ДНК

Эндонуклеазы рестрикции представляют собой дезоксирибонуклеазы, которые расщепляют двухцепочечную ДНК на фрагменты. С одним исключением, все рестрикционные эндонуклеазы распознают короткие

неметилированные последовательности ДНК. Эндонуклеазы рестрикции можно разделить на две группы в зависимости от положения сайта расщепления относительно последовательности узнавания. Эндонуклеазы рестрикции класса I расщепляют двухцепочечную ДНК в положениях вне последовательности распознавания и генерируют фрагменты относительно случайного размера. Сайты расщепления рестрикционных эндонуклеаз класса II расположены, в большинстве случаев, в последовательности узнавания. Большинство рестрикционных эндонуклеаз класса II распознают палиндромы размером 4, 5 или 6 пар оснований и генерируют фрагменты либо с тупыми концами, либо с липкими концами. Фрагменты ДНК с липкими концами содержат нуклеотидные одноцепочечные хвосты. Эндонуклеазы рестрикции типа II используют Mg^{2+} -зависимый механизм для расщепления обеих цепей ДНК, обычно в пределах короткой палиндромной последовательности [29]. Фрагменты ДНК, полученные рестрикционным расщеплением рестриктаз II класса, можно разделить в гелях в соответствии с их молекулярной массой. Фрагменты могут быть выделены из геля и использованы для анализа последовательности для выяснения генетической информации, хранящейся в ДНК. Кроме того, выделенный фрагмент может быть вставлен в небольшую внехромосомную ДНК, например плазмидную, фаговую или вирусную ДНК, а также его репликация и экспрессия могут быть изучены в клонах прокариотических или эукариотических клеток. Эндонуклеазы рестрикции и технология клонирования являются мощными современными инструментами для решения генетических проблем в медицине, сельском хозяйстве и промышленной микробиологии [30].

1.9 Полиморфизм ДНК

Генетический полиморфизм определяется как возникновение множества аллелей в локусе, где по меньшей мере два аллеля встречаются с

частотой, превышающей 1%. Существование разных версий одного и того же генетического материала у разных людей побудило их использовать в качестве генетических маркеров. Это особенно касается ферментов человека и других белков, у которых полиморфизмы обнаруживаются в группах населения. Можно сказать, что их практическое использование в медицинской генетике рассматривается для картирования генов в отдельных хромосомах с помощью анализа сцепления (предсимптомной и пренатальной диагностики генетических заболеваний, оценки лиц высокого и низкого риска с предрасположенностью к общим расстройствам у взрослых (например, сахарный диабет) и типированию тканей для трансплантации тканей и органов [31].

Полиморфизмы ДНК впервые были описаны в 1970-х - начале 1980-х годов. С тех пор их число известных полиморфизмов и их типы быстро расширяется. Характерная изменчивость полиморфизмов ДНК привела к концепции снятия отпечатков ДНК в 1985 году, когда А. Джеффрис и коллеги описали, как более сложные полиморфизмы ДНК (так называемые мини-сателлиты) могут быть использованы для создания профилей идентификации ДНК для отдельных лиц [32].

Полиморфизмы ДНК и генетические маркеры имеют широкое применение в генетических и геномных исследованиях, таких как картирование сцепления, маркировка генов, генетические вариации и эволюция. Традиционные методы идентификации полиморфизмов являются трудоемкими и дорогостоящими. Идентификация полиморфизма на основе EST является более эффективной и дешевой альтернативой. Этот подход *in silico* был успешно использован для обнаружения нескольких генетических маркеров, таких как SNP-маркеры [33]. Есть несколько основных видов полиморфизмов:

1. Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) представляют собой наиболее распространенную форму генетической изменчивости в геноме человека и способствуют развитию многих сложных фенотипов [34]. SNP

являются очень полезными ресурсами в генетических и геномных исследованиях на животных, растениях и грибах. SNP можно обнаружить с помощью двух основных подходов. Один из них основан на влажных лабораторных методах, таких как гибридизация олигонуклеотидов, лигирование, удлинение праймеров и секвенирование продуктов ПЦР, что является неэффективным и дорогостоящим. Другая, более эффективная альтернатива - это метод *in silico* с использованием последовательностей генома или EST. По сути, обнаружение SNP заключается в выявлении аллельной гетерогенности.

2. Изменение числа копий (CNV). Относительно недавним открытием в генетической изменчивости человека стало разное количество копий генов (CNV) как фактора, способствующего наследственным нарушениям у человека. Хотя с 1970-х годов были известны как мелкие, так и большие случаи делеции и дупликации последовательности ДНК человека, основанные на цитогенетическом бэндинге, только недавно стала широко распространена роль, которую они играют в заболевании. Размер CNV может варьироваться от нескольких нуклеотидов до тысяч, а иногда и сотен тысяч или миллионов килобаз. Эти варианты могут содержать один или несколько генов, которые могут существовать в двух, трех или более копиях, расположенных в тандеме в определенных хромосомных положениях. Когда эти тандемные массивы в основном идентичных последовательностей выравниваются во время мейоза, иногда происходит смещение, которое может привести к удалению или дублированию одной или нескольких копий. Это событие, в свою очередь, может создать диапазон количества копий от нуля до десяти и более. Когда функциональные гены или функциональные регуляторные элементы содержатся в скопированном или удаленном элементе, количество произведенного генного продукта может быть увеличено или уменьшено по сравнению с контрольным уровнем. Ранние примеры, в которых CNVs способствовали заболеванию, включают делецию

22q синдрома ДиДжорджа и делеции, связанные с атрофией мышц позвоночника и болезнью Шарко – Мари – Тута [35].

1.10 Методы изучения полиморфизма ДНК

1. Гель-электрофорез в денатурирующих или температурных градиентах (DGGE / TGGE)

В DGGE ДНК, полученная из чистых культур или окружающей ДНК, амплифицируется с использованием специфических праймеров и затем подвергается электрофорезу в полиакриламидном геле. Разделение ДНК происходит на основе их подвижности на гелях, состоящих из возрастающих концентраций денатурирующих ДНК (мочевина и формамид). Тот же принцип применяется в TGGE, с той лишь разницей, что значение градиента температуры используется на геле. Для филогенетической идентификации отпечатков пальцев, полученных этими методами, требуются специальные зонды и праймеры для конкретных таксономических / функциональных групп.

2. Однонитевой конформационный полиморфизм

В этом методе амплифицированные продукты отпечатков пальцев разделяют электрофоретически в соответствии с их подвижностью на полиакриламидном геле (неденатурирующем) после денатурации, а затем анализируют отдельные нити ДНК

3. Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD)

Этот метод применяет использование низкой температуры отжига (35 °C) для коротких последовательностей праймеров (до 10 нуклеотидов), которые случайным образом связываются с геномом с комплементарными областями. Генерируемые ампликоны разделяют в соответствии с их длиной на агарозном или полиакриламидном геле. Этот метод очень чувствителен к смещениям ПЦР (температура отжига, концентрация MgCl₂, используемая матричная ДНК и праймеры). Дискриминация лучше всего, когда несколько

наборов праймеров используются для создания последовательных шаблонов. Следовательно, чтобы получить наиболее различимый образец между видами и штаммом, важно использовать правильные наборы праймеров и оптимизированные условия реакции [36].

4. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP) является одним из самых простых способов изучения полиморфизма ДНК. В методе используется простое рестрикционное расщепление очищенной ДНК, а изменение характера полос в расщеплении выявляет генетическое разнообразие [37]. RFLP-анализ можно использовать для анализа вариаций как в митохондриальной, так и в ядерной ДНК. В зависимости от того, какие рестрикционные ферменты используются и какие последовательности-мишени анализируются, могут наблюдаться значительные различия. Однако анализ RFLP требует относительно больших количеств очень чистой ДНК. ДНК должна быть выделена, подвергнута электрофорезу, блоттингу и исследованию для выявления изменений [38].

RFLP – мощный метод для обнаружения известных мутаций и полиморфизма специфических генов при условии сочетания подходящих праймеров и рестрикционного фермента [3]. Например, ПЦР-RFLP-анализ в сочетании с капиллярным электрофорезом был успешно применен для ДНК-диагностики болезни Альцгеймера. Недавно было доказано, что аллель типа 4 гена аполипопротеина E (APOE) является основным фактором риска поздней семейной и спорадической болезни Альцгеймера (возраст после 60 лет) и спорадической болезни Альцгеймера с ранним началом (возраст до 60 лет). Эти важные данные указывают на то, что генотипирование APOE позволяет диагностировать болезнь Альцгеймера. Обычные полиморфизмы APOE определяются тремя типами аллелей. Этот полиморфизм приводит к шести генотипам APOE, сочетающих аллели E2, E3 и E4. Риск болезни Альцгеймера увеличился с 20% до 90% с увеличением числа аллелей APOE E4. Анализ RFLP с использованием рестриктазы *NhaI* дает константные фрагменты 16, 18, 35 п.н. и четыре основных полиморфных фрагмента 48, 72,

83 и 91 п.н.. Таким образом, анализ методом ПЦР-RFLP с использованием капиллярного электрофореза предсказывает, что риск болезни Альцгеймера для индивида с генотипом E4 / E4 составляет около 90%, а риск для человека, имеющего генотип E3 / E4, составляет 47% [3].

5. Полиморфизм длин терминальных рестриционных фрагментов. T-RFLP представляет собой молекулярный метод, основанный на положении сайта рестрикции, ближайшего к меченому концу амплифицированной последовательности гена. T-RFLP использует один 5'-флуоресцентно меченный праймер во время реакции ПЦР, и продукты ПЦР расщепляют рестриционным ферментом (ферментами), а терминальные рестриционные фрагменты отделяют на автоматическом секвенаторе ДНК.

В анализе T-RFLP обнаруживаются только концевые флуоресцентно-меченные рестриционные фрагменты, что упрощает структуру полос и позволяет анализировать, в частности, сложные микробные сообщества [39].

6. Рестриционный анализ амплифицированной рДНК. ARDRA, основанный на расщеплении рестриционной эндонуклеазой амплифицированной бактериальной 16S рДНК, представляет собой генотипирование / риботипирование «отпечатков пальцев» на основе рДНК [15]. ARDRA представляет собой расширение RFLP на ген, кодирующий 16S рРНК бактерий. Этот метод включает ферментативную амплификацию с использованием праймеров, направленных на консервативные области на концах гена 16S, с последующим расщеплением с использованием ферментов рестрикции тетракутра (например, AluI и HaeIII). Ограниченные фрагменты разделяются на агарозных или полиакриламидных гелях [40].

7. Денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография (DHPLC) использует жидкостную хроматографию с обращенной фазой ионных пар для обнаружения гетеродуплексов ДНК. При частично денатурирующих условиях гетеродуплексы денатурируют быстрее и демонстрируют уменьшенное время удерживания в колонке по сравнению с их полностью комплементарными гомодуплексными аналогами, которые

обнаруживаются как новые хроматографические пики при более низком времени удерживания. Время анализа быстрое, от 6 до 10 минут на образец для размеров фрагментов от 200 до 700 п.о. Однако в современных приборах можно анализировать только один образец за один раз, и параллельный анализ пока невозможен. Ввиду этой низкой пропускной способности ДНПЛС не очень подходит для крупномасштабных испытаний [41].

8. MALDI-TOF MS. Масс-спектрометрия времени пролета с помощью матричной лазерной десорбции или ионизации является привлекательной платформой для высокопроизводительного генотипирования SNP. Представляющие интерес последовательности амплифицируют методом ПЦР с использованием праймеров, которые узнают две разные последовательности промотора РНК-полимеразы на каждом конце продукта амплификации. Впоследствии РНК-транскрипты генерируются путем транскрипции *in vitro* с различных промоторов, а транскрипты расщепляются нуклеотид-специфическими рибонуклеазами, такими как РНКаза А (С- и U-специфичное расщепление) или РНКаза Т1 (G-специфическое расщепление).. Продукты расщепления затем разделяют с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF для создания информативной картины массового сигнала, где каждый пик представляет по меньшей мере один фрагмент расщепления. Сравнение экспериментального образца расщепления с образцами дикого типа или с эталонным сигналом массива *in silico* показывает наличие мутации в виде массовых сдвигах пиков, отсутствии их или дополнительных пиков [42].

2 Материалы и методы

2.1 Объекты

Образцы непатогенных почвенных бактерий, использованные для посева и выделения ДНК, были получены от Демьянчук Д.А. и высеяны мной на кафедре биотехнологии в октябре 2019 года. Все образцы предварительно были определены методом масс спектроскопии.

2.2 Техника посева микроорганизмов на агаризованную среду

Посев микроорганизмов проводился на скошенный агар в пробирках.

Ход процесса:

1. Пробирку с культурой взяла так, чтобы поверхность питательной среды с налетом бактерий была обращена кверху и хорошо видна. Пробирку держала в горизонтальном положении или под наклоном. Далее в правую руку взяла петлю так, как держат ручку, и подержала в пламени горелки до красноты. Затем мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижала ватную пробку к ладони, вынула ее из пробирки и держала так во время следующих действий.

2. Края открытой пробирки с культурой бактерий обожгла в пламени горелки и после этого ввела в пробирку микробиологическую петлю (стерильную).

3. После взятия небольшого количества бактериальной массы с поверхности субстрата, вынула петлю из пробирки, не касаясь ее стенок или краев.

4. Горлышко пробирки снова обожгла в пламени горелки, затем обожгла ватную пробку и закрыла ею пробирку.

5. Далее извлеченный материал использовала для пересева культуры в свежую среду.

6. Петлю ввела в пробирку до конца и, слегка касаясь ею поверхности агара, провела снизу-вверх зигзагообразную черту – штрих. При этом стараются не повредить поверхность плотной среды.

7. Оставшиеся на петле после пересева клетки бактерий тщательно сожгла в пламени горелки [43].

2.3 Методика выделение ДНК

Выделение бактериальной геномной ДНК проводили при помощи набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (производства КНР). Методика выделения основана на эффективном выходе геномной ДНК посредством специального лизисного буфера GA (лизисный буфер). После этого быстрое отделение геномной ДНК от протеинов, полисахаридов и липидов достигается уникальным фазоразделительным шагом при добавлении буфера DV. Высокоочищенная геномная ДНК находится в нижней фазе. Затем нижнюю фазу с растворённой в ней ДНК наносят на фильтр и центрифугируют. На фильтре оседают оставшиеся белки, липиды и полисахариды, а также клеточные стенки бактерий. Следующим шагом раствор ДНК наносят на колонку, где ДНК связывается с ней благодаря буферу BV (ДНК связывающий буфер). Центрифугируют один раз после добавления промывочного буфера W1 и два раза после добавления буфера W2. Центрифугируют 2 минуты при 12000 оборотах. Это делают для того чтобы очистить ДНК от нежелательных молекул и солей, которые могли пройти через фильтр. Очищенная бактериальная ДНК вымывается с колонки элюентом или дистиллированной водой.

Ход процесса выделения:

1. Брала примерно 1×10^9 бактерий в 2 мл. пробирку для микроцентрифугирования (идет в наборе). Откручивала на центрифуге на максимальной скорости 12000 оборотов в течение 30 секунд. Удаляла супернатант и ресуспендировала бактериальный осадок в 150 мкл буфера S, содержащего РНК-азуА.
2. Добавила 20 мкл лизоцима и хорошо перемешала. Держала при комнатной температуре в течение 5 минут.
3. Добавила 30 мкл 0,25 М ЭДТА (рН 8,0). Хорошо перемешала на вортексе и инкубировала в холоде в течение 5 минут.
4. Добавила 450 мкл буфера G-A и встряхнула на вортексе в течение 15 секунд. Нагрела на водяной бане при температуре 65°C в течение 10 минут.
5. Добавила 400 мкл буфера G-B, а затем 1 мл буфера DV (предварительно охлажденного до 4°C). Перемешала на центрифуге при 12000 оборотов в течение 2 минут.
6. Забирала как можно больше надосадочной жидкости, не нарушая интерфазу. Верхнюю фазу отбросила.
7. Добавила 1 мл буфера DV (предварительно охлажденного до 4°C) к оставшимся средней и нижней фазам. Встряхнула на вортексе для достижения гомогенности. Далее открутила на центрифуге при 12000 оборотах в течение 2 минут.
8. Отбросила цветную верхнюю фазу. Перенесла нижнюю фазу на спин-фильтр, помещенный в 2 мл пробирку для микрофугирования (прилагается) и центрифугировала при 12000 оборотах в течение минуты.
9. Выбросила Spin-фильтр. В пробирку добавила 400 мкл буфера BV к фильтрату и хорошо перемешала.
10. Поместила колонку Miniprep в пробирку для микроцентрифугирования объемом 2 мл (прилагается). Перенесла связующую смесь из шага 9 к колонке Miniprep. Центрифугировала при 12000 оборотах в течение минуты.

11. Убрала фильтрат из пробирки для микроцентрифугирования. Поместила колонку Miniprep обратно в 2 мл Микроцентрифужную пробирку. Добавила 500 мкл буфера W1 в колонку Miniprep и центрифугируем при 12000 оборотах в течение минуты.

12. Отбросила фильтрат и поместила колонку Miniprep обратно в пробирку для микроцентрифугирования 2 мл. Добавила 700 мкл Буфера W2 и центрифугировала при 12000 оборотах в течение минуты. Повторила этот шаг очистки со вторыми 700 мкл буфера W2.

13. Убрала фильтр. Поместила колонку Miniprep обратно в 2 мл микроцентрифужную пробирку. Центрифугировала при 12000 оборотах в течение минуты.

14. Перенесла колонку Miniprep в чистую 1,5 мл пробирку для микроцентрифуги (прилагается). Чтобы элюировать ДНК, добавила 100-200 мкл деионизированной воды или элюента к центру мембраны. Инкубировала 1 минуту при комнатной температуре, а затем центрифугировала при 12000 оборотах в течение минуты.

Хранить препараты ДНК рекомендуется при температуре 2-8 не более 2 недель или до 6 месяцев при -18 не допуская частого замораживания-оттаивания.

2.4 Методика проведения ПЦР

Для проведения реакции ПЦР требуются:

1. 27 мкл дистиллированной воды;
2. 5 мкл 10-кратного буфера;
3. 5 мкл dNTP;
4. по 5 мкл праймеров (8F и 1492R – для ампликонов размеров 1500 п.о.);
5. 3 мкл $MgCl_2$ с концентрацией 2.5mM;

6. по 2 мкл образцов выделенной ДНК;
7. 1 мкл Hot start ДНК-полимеразы (сибэнзим)

Все вещества смешивали в 1 пробирке объемом 1,5 мл из расчета на 11 проб, затем в каждую было добавлено по 47 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемой ДНК. Далее пробы помещала в амплификатор Bio-rad – MJ Mini Personal Thermal Cycler. ПЦР проходила в соответствии с программой:

1. 95°C – 4:00;
2. 95°C – 0:16;
3. 58°C – 0:22;
4. 72°C – 1:55;
5. GO TO 2 36 times;
6. 72°C – 6:30;
7. 4°C – 18:00:00;
8. END

Далее полученные ампликоны подвергались электрофорезу.

2.5 Методика очистки ампликонов

Очистка ампликонов производилась с помощью набора Diatom DNA Clean-UP, производство фирмы IsoGene.

Очистка ампликонов с использованием набора реагентов DiatomDNA Clean-UP основана на использовании солубилизирующего реагента (в соотношении пробы к солубилизируемому реагенту), в присутствии которого ДНК сорбируется на поверхности Nucleos сорбента. Количество добавляемого сорбента зависит от количества ДНК в пробе (обычно соотношение 1:2). Время сорбции составляет 5-7 минут с последующей отмывкой спиртовым раствором (этанол). Таким образом ДНК полностью очищается от сопутствующих примесей: избытка праймеров, димеров-праймеров, dNTP, с дальнейшей элюацией с сорбента бидистиллированной

водой. Очищенная таким методом ДНК может быть использована для дальнейшей рестрикции и секвенирования [44].

Данный набор обеспечил высокую чистоту очищенной ДНК (A_{260}/A_{280} в диапазоне 1.8-2.0) и особенно эффективен при очистке ДНК размером от 200 до 20 000 п.н.

2.6 Проведение реакции рестрикции

Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводила в течение 2 ч. в приборе Thermomixer comfort производство фирмы Eppendorf. Реакция проходила 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 смешала на холоде в 1 пробирке объемом 2 мл, из расчета на 15 проб, затем в каждую пробирку добавила по 35 мкл данной смеси и по 15 мкл исследуемой ДНК.

В работе использовались рестриктазы MspI, HaeIII, RsaI, HhaI, BstNHI фирмы СибЭнзим.

Для визуализации результатов рестрикции использовала электрофорез.

2.7 Методика проведения электрофореза

Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод, используемый для разделения и идентификации фрагментов ДНК.

Оборудование для проведения и документирования электрофореза:

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

Реактивы, необходимые для проведения электрофореза:

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

Ход реакции

1. Взвесила агарозу и добавила ее к соответствующему количеству 0.5x TAE буфера;
2. Поместила в работающую микроволновую печь на 45-50 сек., до получения однородной суспензии, затем остудила до 600 С;
3. Установила гребенку в форму для агарозы (форму выровняла по уровню, для равномерного нанесения раствора);
4. Перелила раствор в форму для агарозы;
5. Оставила гель на 25 минут для застывания;
6. Удалила гребенку и поместила гель в электрофоретическую кювету;
7. Покрыла гель слоем электрофоретического буфера (гель должен быть покрыт буфером, толщина которого 1см);
8. Смешала пробы ДНК с буфером для нанесения пробы (содержащим глицерин и красители) в соотношении 5:1. Внесла смесь в

лунки геля под электрофоретический буфер с помощью самплера. Нанесла маркер (в 1 и последнюю лунки);

9. Подсоединила электроды, установила напряжение и время, запустила электрофорез;

10. Сверху положила хладагент;

11. После окончания электрофореза достала гель и погрузила его в бромистый этидий для окрашивания и поставила на вортекс, на 25 минут;

12. Промыла гель дистиллированной водой;

13. Окрашенный гель поместила в трансиллюминатор;

14. Рассмотрела гель в ультрафиолетовом свете и документировала полученные изображения [45].

3 Результаты

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты, с 33 по 41 страницу, результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

3.1 Выделение ДНК из биомассы бактерии

Изъято 2 страницы

3.2 Получение ампликонов 8F-1492R гена 16S рРНК

Изъята 1 страница

3.3 Сравнение теоретических электрофореграмм ампликонов гена 16S рРНК после обработки различными рестриктазами с электрофореграммами из нашей базы данных.

Изъято 6 страниц

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы был проведен анализ ARDRA ампликонов 8F – 1492R гена 16S рРНК бактерий, высеянных мной на кафедре биотехнологии. Была выделена ДНК данных образцов бактерий, проведены амплификация и реакции рестрикции, данные были визуализированы с помощью электрофореза в агарозном геле. Путём сравнения теоретических электрофореграмм из нашей базы данных и полученных мною практических электрофореграмм были идентифицированы предоставленные образцы бактерий. Они оказались представителями видов *Bacillus Pumilus*, *Bacillus Cereus*, *Achromobacter Xylooxidans*, *Agrobacterium Tumefaciens*, *Arthrobacter globiformis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus atrophaeus*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Exiguobacterium aurantiacum*.

Наилучшим выбором набора рестриктаз для выявления вида бактерий с использованием рестриктового анализа ампликонов 8F-1492R оказались MspI, HaeIII, RsaI, HhaI, BstHNI.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

п.о. – пар оснований

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

АПОЕ – Аполипопротеин Е

ARDRA – Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

bp – base pairs

BSA – бычий сывороточный альбумин

CNV – Copy number variation

DGGE – Denaturing gradient gel electrophoresis

dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат

HGT – Horizontal gene transfer

kb – килобазы

NCBI – National Center for Biotechnology Information

SAM – S-аденозил-1-метионин

SNP – single-nucleotide polymorphism

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP – Restriction fragment length polymorphism

TGGE – Temperature gradient gel electrophoresis

T-RFLP – Terminal restriction fragment length polymorphism

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. 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.
2. Vesterlund, S. R. Molecular identification of cryptic bumblebee species from degraded samples using PCR–RFLP approach / S. R. Vesterlund, J. Sorvari, A. Vasemägi // *Molecular Ecology Resources*. - 2014. - V. 14, I 1. - P. 122-126.
3. Baba, Y. Analysis of disease-causing genes and DNA-based drugs by capillary electrophoresis towards DNA diagnosis and gene therapy for human diseases/ Y. Baba// *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*.- 1996.- V. 687, I. 2.- P. 271-302
4. Ulfelder, K. J. Restriction fragment length polymorphism analysis of ERBB2 oncogene by capillary electrophoresis/ K. J. Ulfelder, H. E. Schwartz, J. M. Hall, F. J. Sunzeri// *Analytical Biochemistry*.- 1992.- V. 200, I. 2.- P. 260-267
5. Schlenck, A. High-resolution separation of PCR product and gene diagnosis by Capillary gel electrophoresis/ A. Schlenck, S. Visvikis, M. O'Kane, G. Siest// *Biomedical chromatography : BMC*.- 1996.- V.10, I. 1.- P. 48-50
6. Gelfi, C. Simultaneous detection of $\Delta F508$, G542X, N1303K and 1717-1G→A mutations in cystic fibrosis by capillary electrophoresis in polymer networks/ C. Gelfia, P. G. Righettib, C. Magnanic, L. Cremonesic, M. Ferrarid// *Clinica Chimica Acta*.- 1994.- V. 229, I. 1-2.- P. 181-189
7. Панчин, А. Ю. Сумма биотехнологии / А. Ю. Панчин. – Москва : АСТ, 2015. – 432 с.
8. Miyoshi, D. Molecular crowding effects on structure and stability of DNA/ D. Miyoshia, N. Sugimoto// *Biochimie*.- 2008.- V. 90, I. 7.- P. 1040-1051
9. Kaushik, M. A bouquet of DNA structures: Emerging diversity/ M. Kaushik, S. Kaushik, K. Roy, A. Singh, S. Mahendru, M. Kumar, S. Chaudhary, S. Ahmed, S. Kukreti// *Biochemistry and Biophysics Reports*.- 2016.- V. 5.- P. 388-395

10. Dickerson, R. E. DNA structure from A to Z/ R. E. Dickerson// *Methods in Enzymology*.- 1992.- V. 211.- P. 67-111
11. Moreno, N. N. Chromatin, DNA structure and alternative splicing/ N. N. Moreno, L. E. Giono, A. E. Cambindo Botto, M. J. Muñoz, A. R. Kornblihtt// *FEBS Letters*. - 2015.- V. 589, I. 22.- P. 3370-3378
12. Lagomarsino, M. C. From structure to function of bacterial chromosomes: Evolutionary perspectives and ideas for new experiments/ M. C. Lagomarsino, O. Espéli, I. Junier// *FEBS Letters*.- 2015.- V. 589, I. 20.- P. 2996-3004
13. Dobrindt, U. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria/ U. Dobrindt, J. Hacker// *Current Opinion in Microbiology*.- 2001.- V. 4, I. 5.- P. 550-557
14. Dionisio, F. Interactions between plasmids and other mobile genetic elements affect their transmission and persistence/ F. Dionisio, R. Zilhão, J. A. Gama// *Plasmid*.- 2019.- V. 102.- P. 29-36
15. Nazir, R. Freshwater Microbiology: Perspectives of Bacterial Dynamics in Lake Ecosystems/ R. Nazir, S. Rehman, M. Nisa, U. ali Baba.- Academic press, 2019.- P. 263-306
16. Oliveira, P. H. Conserved DNA Methyltransferases: A Window into Fundamental Mechanisms of Epigenetic Regulation in Bacteria/ P. H. Oliveira, G. Fang// *Trends in Microbiology*.- 2020.- P. 1-13
17. Roberts, R. J. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes/ R. J. Roberts, M. Belfort, T. Bestor, A. S. Bhagwat, T. A. Bickle, J. Bitinaite, R. M. Blumenthal// *Nucleic Acids Research*.- 2003.- V. 31, I. 7.- P. 1805–1812
18. Trček, J. Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry/ J. Trček, F. Barja// *International Journal of Food Microbiology*.- 2015.- V. 196.- P. 137-144

19. Tringe, S. G. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene/ S. G. Tringe, P. Hugenholtz// *Current Opinion in Microbiology*.- 2008.- V. 11, I. 5.- P. 442-446
20. Sune, D. Optimization of 16S rRNA gene analysis for use in the diagnostic clinical microbiology service/ D. Sune, H. Rydberg, Å. N. Augustinsson, L. Serrander, M. B. Jungeström// *Journal of Microbiological Methods*.- 2020.- V. 170.- P. 105
21. Chachaty, E. Isolating Chromosomal DNA from Bacteria / E. Chachaty, P. Saulnier. // *The Nucleic Acid Protocols Handbook*, Springer. - 2000. - P. 29-32.
22. Butler, J. M. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Chapter 2 - DNA Extraction Methods/ J. M. Butler.- Academic press, 2012.- P. 29-47
23. Cunha, S. Isolation of the *Escherichia coli* nucleoid/ S. Cunha, T. Odijk, E. Süleymanoglu, C. L. Woldringh// *Biochimie*.- 2001.- V. 83, I. 2.- P. 149-154
24. Bermingham, N. Polymerase chain reaction and its applications/ N. Bermingham, K. Luettich// *Current Diagnostic Pathology*.- 2003.- V. 9, I. 3.- P. 159-164
25. Shahi, S. Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in dentistry/ S. Shahi, S. Z. Vahed, N. Fathi, S. Sharifi// *International Journal of Biological Macromolecules*.- 2018.- V. 117.- P. 983-992
26. Brody, J. R. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis/ J. R. Brody, S. E. Kern// *Analytical Biochemistry*.- 2004.- V. 333, I. 1.- P. 1-13
27. Slater, G. W. The theory of DNA separation by capillary electrophoresis/ G. W. Slater, M. Kenward, L. C. McCormick, M. G. Gauthier// *Current Opinion in Biotechnology*.- 2003.- V. 14, I. 1.- P. 58-64
28. Zhang, L. Microchip electrophoresis-based separation of DNA/ L. Zhang, F. Dang, Y. Baba// *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.- 2003.- V. 30, I. 6.- P. 1645-1654

29. Mullins, E. A. Emerging Roles of DNA Glycosylases and the Base Excision Repair Pathway/ E. A. Mullins, A. A. Rodriguez, N. P. Bradley, B. F. Eichman// Trends in Biochemical Sciences.- 2019.- V. 44, I. 9.- P. 765-781
30. Szalay, A.A. Restriction endonucleases and their applications/ A. A. Szalay, C. J. Mackey, W. H. R. Langridge// Enzyme and Microbial Technology.- 1979.- V. 1, I. 3.- P. 154-164
31. Forrester, J. V. The Eye (Fourth Edition): Basic Sciences in Practice/ J. V. Forrester, A. D. Dick, P. G. McMennamin, F. Roberts, E. Pearlman.- Elsevier, 2016.- P. 130-156
32. Trent, R. J. Molecular medicine: chapter 9: forensic science and medicine/ R. J. Trent.- Elsevier, 2012.- P. 275- 299
33. Zhang, P. EST Data Mining and Applications in Fungal Genomics/ P. Zhang, X. J. Min// Applied Mycology and Biotechnology.- 2005.- V.5.- P. 33–70
34. Twyman, R. M. Encyclopedia of Neuroscience/ R. M. Twyman.- Academic press, 2009.- P. 871-875
35. Cotton, C. M. Avery's Diseases of the Newborn (Tenth Edition)/ C. M. Cotton, J. C. Murray.- Elsevier, 2018.- P. 180-189
36. Srivastava, N. Microbial Diversity in the Genomic Era: Chapter 6 - Analyzing Functional Microbial Diversity: An Overview of Techniques / N. Srivastava, B. Gupta, S. Gupta, M. K. Danquah, I. P. Sarethy.- Academic press, 2019.- P. 79-102
37. Chatterjee, S. Microbial Diversity in the Genomic Era: Chapter 32 - Pathogenic Microbial Genetic Diversity with Reference to Health/ S. Chatterjee, I. H. Raval.- Academic press, 2019.- P. 559-577
38. Hoy, M. A. Insect Molecular Genetics (Fourth Edition): Chapter 13 - Insect Population Ecology and Molecular Genetics/ M. A. Hoy.- Academic press, 2019.- P. 515-561
39. Bharagava, R. N. Microbial Diversity in the Genomic Era: Applications of Metagenomics in Microbial Bioremediation of Pollutants: From Genomics to

Environmental Cleanup/ R. N. Bharagava, D. Purchase, G. Saxena, S. I. Mulla.- Academic press, 2019.- P. 459-477

40. Panigrahi, S. Microbial Diversity in the Genomic Era: Functional Microbial Diversity in Contaminated Environment and Application in Bioremediation/ S. Panigrahi, P. Velraj, T. S. Rao.- Academic press, 2019.- P. 359-385

41. Suh, Y. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes/ Y. Suha, J. Vijg// Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.- 2005.- V. 573, I. 1–2.- P. 41-53

42. Peters, T. Current methods for high-throughput detection of novel DNA polymorphisms/ T. Peters, R. Sedlmeier// Drug Discovery Today: Technologies.- 2006.- V. 3.- P. 123–129

43. Лысак, В. В. Микробиология. Практикум: пособие/ В. В. Лысак, Р. А. Желдакова, О. В. Фомина. – Минск : БГУ, 2015. – 115 с.


44. Vogelstein, B. Preparative and analytical purification of DNA from agarose / B. Vogelstein, D. Gillespie // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 1979. - V. 76, I. - 2. - P. 615-619.

45. Elkins, K. M. Forensic DNA Biology: Determination of quality and quantity of dna using agarose gel electrophoresis/ K. M. Elkins.- Elsevier, 2013.- P. 53–57

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


«29» 06 2020 г

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

«Рестрикция ампликонов 8F – 1492R гена 16S рРНК»

06.03.01 - Биология

Научный руководитель  26.06.2020 доцент, к.б.н О.А.Гусейнов
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник  26.06.2020 Ю.А. Бурдинская
подпись, дата инициалы, фамилия

Красноярск 2020