

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.

## **БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

«Выделение и исследование ДНК бактерий»

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

Выпускник \_\_\_\_\_ А.О. Холошенко

Красноярск 2020

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Выделение и исследование ДНК бактерий» содержит 46 страниц текстового документа, 2 таблицы, 9 иллюстраций и 47 источников использованной литературы.

### ДНК, ГЕН 16S рРНК, ЭЛЕКТРОФОРЕЗ, РЕСТРИКТНЫЙ АНАЛИЗ, АНАЛИЗ АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ РИБОСОМАЛЬНОЙ ДНК

Цель данной работы: Оптимизировать методику выделения ДНК из бактерий и использовать полученные образцы ДНК для дальнейшего рестрикционного анализа.

На основании поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Оптимизировать процедуру выделения ДНК бактерий и использовать полученные образцы ДНК для получения ампликонов гена 16S рРНК;
2. Провести гель-электрофорез полученных ампликонов гена 16S рРНК с целью проверки их качества;
3. Провести рестрикцию полученных ампликонов и гель-электрофорез полученных рестриктов с маркерами в агарозном геле для пополнения нашей базы данных электрофореграмм;
4. Задokumentировать полученные результаты с помощью геле-документирующей системы.
5. Используя базу данных GenBank построить виртуальные электрофореграммы ряда видов бактерий и сравнить их с полученными экспериментально.

Для ДНК-диагностики, ПЦР и многих других анализов необходимо уметь выделять качественные препараты ДНК. Идентификация бактерий с использованием ПЦР остается особенно актуальной для редких, медленно растущих и некультивируемых бактерий. В ходе проведенной работы было показано, что метод ARDRA можно использовать для достоверного и быстрого сравнения и определения видов бактерий.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1 Обзор литературы .....	6
1.1 ДНК .....	6
1.2 Генетическая система бактерий .....	7
1.3 Ген 16S рРНК .....	9
1.4 Клеточная стенка бактерий.....	10
1.5 Выделение ДНК лизисным методом .....	11
1.6 Полимеразная цепная реакция .....	12
1.7 Термостабильные ДНК-полимеразы .....	15
1.8 Электрофорез .....	15
1.9 Рестриктивный анализ ДНК .....	18
1.10 Рестрикционный анализ амплифицированной рибосомальной ДНК (метод ARDRA).....	20
2 Материалы и методы .....	22
2.1 Используемые образцы биомассы почвенных бактерий.....	22
2.2 Методика посева микроорганизмов на агаризованную среду .....	22
2.3 Методика выделения ДНК.....	23
2.4 Методика проведения электрофореза.....	25
2.5 Методика проведения ПЦР.....	27
2.6 Проведение реакции рестрикции .....	28
2.7 Методика анализа <i>in silico</i> .....	28
3 Результаты.....	30
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	40
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	42

## ВВЕДЕНИЕ

Бактерии остаются древнейшей группой организмов. Множество полезных и патогенных бактерий сопровождают человека на протяжении всей жизни и защищают наш организм от нежелательных внешних воздействий или, наоборот, являются возбудителями многих заболеваний. Они применяются в пищевой промышленности, в сельском хозяйстве, в медицине, при добыче полезных ископаемых и во многих других сферах жизни человека.

В последнее десятилетие, в результате широкого использования ПЦР и изучения ДНК, последовательность гена 16S рНК играет ключевую роль в точной идентификации бактерий и открытии новых штаммов в микробиологических лабораториях. Идентификация бактерий рестрикционным анализом амплифицированного гена рНК остается актуальной для редких, медленно растущих и некультивируемых бактерий. Она не только дает представление об этиологии инфекционных заболеваний, но также помогает врачам в выборе антибиотиков и в определении продолжительности лечения и процедур инфекционного контроля. Поэтому анализ последовательности ДНК эволюционно-стабильных маркерных генов рассматривается в качестве генеральной стратегии изучения филогении и разнообразия бактерий [1].

Процедура выделения ДНК является важнейшим этапом в исследовании бактерий. От ДНК напрямую или через белки-ферменты зависят все процессы биосинтеза и катаболизм микроорганизмов. Поэтому необходимо научиться выделять достаточное количество исходного биологического материала для того, чтобы получить хорошую степень очистки ДНК, которая в дальнейшем может быть использована для ДНК-диагностики, ПЦР и многих других анализов.

**Актуальность** данной темы также обусловлена тем, что бактерии и продукты их жизнедеятельности применяются для создания: биопрепаратов

для очистки почв, сточных вод от трудноразлагаемых веществ (нефть, нефтепродукты, тяжелые металлы, пестициды и пр.), противомикробных, противовирусных, противогрибковых препаратов, удобрений. Многие бактерии являются причиной различных заболеваний.

### **Цель данной работы:**

Оптимизировать методику выделения ДНК из бактерий и использовать полученные образцы ДНК для дальнейшего рестрикционного анализа.

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

- 1) Оптимизировать процедуру выделения ДНК бактерий и использовать полученные образцы ДНК для получения ампликонов гена 16S рРНК;
- 2) Провести гель-электрофорез полученных ампликонов гена 16S рРНК с целью проверки их качества;
- 3) Провести рестрикцию полученных ампликонов и гель-электрофорез полученных рестриктов с маркерами в агарозном геле для пополнения нашей базы данных электрофореграмм;
- 4) Задokumentировать полученные результаты с помощью геле-документирующей системы.
- 5) Используя базу данных GenBank построить виртуальные электрофореграммы ряда видов бактерий и сравнить их с полученными экспериментально.

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

# 1 Обзор литературы

## 1.1 ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) относится к сложным высокомолекулярным соединениям, которые состоят из индивидуальных химических компонентов более простого строения. При полном гидролизе, т.е. нагревании в присутствии хлорной кислоты, в гидролизате обнаруживают пуриновые (аденин и гуанин) и пиримидиновые (цитозин и тимин) основания, углеводное соединение (дезоксирибоза) и остаток фосфорной кислоты. Структура молекулы ДНК получила название «двойной спирали» [2].

В эукариотических клетках ДНК присутствует в своей суперскрученной форме и находится в ядре. Тем не менее, во время биологических процессов, таких как репликация и транскрипция, ДНК раскручивается [3]. ДНК бактерий имеет кольцевую структуру и прикрепляется к клеточной мембране. У бактерий и низших эукариот также встречаются небольшие автономные, кольцевые молекулы ДНК - плазмиды [4].

Широко признанной структурой ДНК является структура классической двойной спирали ДНК, которая определяет структурную основу для генетического кода посредством определенного спаривания оснований [5]. Двойные нити скрепляются друг с другом комплементарной водородной связью между основаниями противоположных нитей и приобретают вид двойных спиралей, состоящих из гидрофобного ядра [6]. При этом аденин связывается только с тимином ( между этими основаниями образуются две водородные связи), гуанин — только с цитозином (образуются три водородные связи) [7].

Каждая цепочка ДНК в спирали обеспечивает идеальный шаблон для другой, считывая базовую последовательность в противоположных направлениях [8]. Такая особенность позволяет почти без ошибок

восстановить последовательность нити, имея на руках ее комплементарную копию. Последовательность нуклеотидов ДНК кодирует информацию о различных типах РНК ( матричных, рибосомальных и транспортных ).

ДНК играет важную биологическую роль. Она не только несёт генетическую информацию, но также и участвует во всех процессах, протекающих в клетке [9].

## **1.2 Генетическая система бактерий**

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

Хромосомы всех организмов должны быть уплотнены почти на три порядка, чтобы поместиться в клетке. ДНК должна быть упакована так, чтобы не затруднять важные процессы (репликацию, транскрипцию, репарацию, рекомбинацию и интеграцию). Эта проблема особенно остра у бактерий, поскольку сегрегация хромосом происходит одновременно с репликацией ДНК, а не разделяется во времени, как у эукариот [10].

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 [11].

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 [12].

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 [13]. Плазмиды – это небольшие молекулы ДНК внутри клетки, физически отделенные от хромосомной ДНК, которые могут реплицироваться независимо. Горизонтальный генетический перенос играет важную роль в разнообразии и эволюции бактерий, поскольку он часто приводит к приобретению новых функций, позволяющих колонизировать новые экологические ниши. Общеизвестно, что плазмиды, которые являются значительным резервуаром гена новизны и чья подвижность вносит свой вклад в видовую пригодность в широком спектре экологических ниш, а



также является предпочтительным способом переноса ДНК [14]. Плазмиды встречаются в виде маленьких круглых двухцепочечных молекул ДНК у бактерий. 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].

Профаговые элементы также часто относятся к внехромосомным. Секвенирование генома показало, что профаги, интегрированные в бактериальную хромосому, имеются в большом количестве, составляя до 20% бактериального генома. Эти последовательности могут принести пользу для здоровья бактериальному хозяину, но могут также спровоцировать гибель клеток посредством индукции [16]. Профаговые элементы можно увидеть у молочнокислых бактерий, а также других практически значимых микроорганизмов. При встраивании бактериофагов в нуклеоид бактерии могут приобретать новые характерные признаки.

### **1.3 Ген 16S рРНК**

Ген, кодирующий 16S рРНК, является одним из наиболее консервативных генов бактериальной ДНК и является общим для всех видов бактерий. Это приблизительно 1500 пар оснований в длину. Ген состоит из консервативных нуклеотидных последовательностей и переменных областей, которые являются специфичными для рода или вида. Гены бактериальной 16S рибосомальной РНК содержат 9 «гипервариабельных областей» (V1 – V9), которые демонстрируют значительное разнообразие последовательностей среди различных бактерий [17]. Консервативные участки позволяют подбирать универсальные праймеры для амплификации

фрагментов гена различной длины [18]. Степень схожести видоспецифичных участков очень хорошо отражает эволюционное родство разных видов. Генетические последовательности переменных областей составляют основу филогенетической классификации микроорганизмов [19].

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 [20,21].

#### **1.4 Клеточная стенка бактерий**

Грамположительные и грамотрицательные бактерии классифицируются по цвету, в который они окрашивают образец после применения химического процесса, называемый окрашиванием по методу Грама. Грамположительные бактерии окрашивают образец в синий цвет после применения окрашивания, а грамотрицательные - в красный. Разная окраска объясняется тем, что стенки клеток отличаются друг от друга.

Двухмембранная клеточная оболочка грамотрицательных бактерий представляет собой сложный барьер, который облегчает поглощение питательных веществ и защищает организм от токсических соединений. Низкая лекарственная проницаемость грамотрицательных веществ обусловлена их сложной двумембранной клеточной оболочкой. Чтобы достичь цитоплазматических мишеней, низкомолекулярные вещества должны сначала пройти через внешнюю мембрану, которая представляет

собой асимметричный бислой, содержащий сетку липополисахаридного полимера на своей внешней поверхности. Эта полимерная сетка выступает барьером для больших молекул независимо от того, являются ли они гидрофобными или гидрофильными. Также известно, что наполненные водой порыны селективны по отношению к гидрофильным молекулам. Далее находится цитоплазматическая мембрана, фосфолипидный бислой, который способствует транспортировке небольших гидрофобных молекул через механизмы диффузии. Такое сложное строение клеточной стенки позволяет грамотрицательным бактериям сохранять устойчивость к антибиотикам и лекарственным препаратам [22]. Кроме того, грамотрицательные вещества также имеют встроенные механизмы для вытеснения токсичных соединений из своей внутренней среды благодаря эффлюксным насосам, которые активно распознают и выводят антибиотики и другие токсины из клетки [23].

Клеточная стенка грамположительных бактерий включает тейхоевые кислоты, полисахариды, полипептиды или белки. Пептидогликан у грамположительных бактерий составляет основную массу клеточной стенки (от 40 до 90 %) [24]. Под электронным микроскопом можно заметить, что клеточная стенка грамположительных бактерий представляет собой гомогенный плотный слой толщиной от 20 до 80 нм, в то время как у грамотрицательных бактерий обнаружена многослойная клеточная стенка. В отличие от клеточной стенки грамотрицательных видов, клеточная стенка грамположительных бактерий плотно прилегает к цитоплазматической мембране

### **1.5 Выделение ДНК лизисным методом**

Выделение ДНК является ключевым элементом исследований, который критически влияет на результат обнаруженного микробного профиля [25]. Стандартизация методов выделения ДНК необходима для последующих

биохимических и диагностических процессов. Такие биохимические процессы как амплификация, сиквенс, гибридизация, проведение обратной транскрипции и синтез ДНК, не могут быть выполнены на биологических образцах, поэтому необходимо предварительное выделение и очистка ДНК.

Методы выделения ДНК классифицируются на прямые (*in situ*) и косвенные (*ex situ*) методы. При прямых методах клетки лизируются в образце почвы с последующим отделением ДНК от клеточного дебриса и почвенного матрикса; и косвенный метод использует разделение клеток с последующим лизисом и восстановлением ДНК. При выборе метода нужно помнить про несколько требований, предъявляемых к конечному результату, например - высокий выход нужного материала; время, требуемое для получения конечного продукта; высокое качество полученного материала [26].

Выделение бактериальной ДНК лизисным методом основывается на выходе ДНК посредством специального лизисного буфера G-A. После этого происходит быстрое отделение геномной ДНК от белков, полисахаридов и липидов с помощью фазо-разделяющего шага. Далее 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, амплификации и т.д.

## **1.6 Полимеразная цепная реакция**

Полимеразная цепная реакция – это метод биохимии, который позволяет добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов ДНК в биологическом материале. Полимеразная цепная реакция - это быстрый, простой и чувствительный метод, который широко используется для оценки разнообразия, численности и активности

медленно растущих бактерий [27]. Данный метод был изобретен американским биохимиком Кэрри Муллисом в 1983 году [28], за разработанный метод он получил Нобелевскую премию в 1993 году.

Основными преимуществами метода ПЦР являются простое количественное определение, высокая чувствительность, точность, быстрый анализ, воспроизводимость, контроль качества и минимальное загрязнение [29]. Огромные образцы могут быть оценены одновременно. Это полезный инструмент в исследовании строго анаэробных микроорганизмов, в которых гибель клеток может произойти во время отбора проб и транспортировки. Жизнеспособность клеток не является важным фактором в методе ПЦР [30]. Метод ПЦР позволяет реплицировать последовательности ДНК или РНК несколько миллионов раз и использует при этом всего 1–100 клеток и 0,1 микролитра крови или клеток. Обратная транскрипционно-полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) - это чувствительный метод выявления вирусов и уровней экспрессии мРНК. ПЦР в реальном времени позволяет оценить фактическое количество мишеней в клинических образцах. Вложенная ПЦР упрощает идентификацию бактериальной ДНК, присутствующей на очень низких уровнях. Мультиплексная ПЦР позволяет исследовать различные организмы или гены в одной реакционной пробирке [31].

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),  $MgCl_2$  и фермент ДНК-полимеразу. Реакционную пробирку затем помещают в амплификатор, который выполняет повторные циклы репликации ДНК:

1. Денатурация ДНК (нагревание реакционной трубки до  $94^\circ C$ ) предназначена для разделения двухцепочечной ДНК и получения двух отдельных нитей молекулы ДНК.

2. Отжиг - при  $50-65^\circ C$ . 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  $72^\circ C$ . Новые комплементарные цепи ДНК синтезируются путем удлинения праймеров с использованием фермента ДНК-полимеразы [32].

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 [33].

## **1.7 Термостабильные ДНК-полимеразы**

ДНК-полимераза - фермент, который синтезирует цепи нуклеотидов из нуклеозидтрифосфатов. ДНК-полимеразы являются критически важными инструментами в биотехнологии, обеспечивая эффективную и точную амплификацию ДНК-матриц, однако многие из желаемых функций недоступны в природных ДНК-полимеразах. Новые или улучшенные функции могут быть сконструированы в ДНК-полимеразах путем мутагенеза или путем создания белковых химер [34].

ДНК-полимеразы добавляют нуклеотиды к 3'-гидроксильной группе предыдущего нуклеотида в цепи ДНК. Все полимеразы работают в направлении 5'--> 3'. ДНК-полимеразы могут точно копировать ДНК, содержащую некоторые виды повреждений, вставляя комплементарный нуклеотид напротив поврежденных оснований, таким образом, позволяя точно амплифицировать поврежденную ДНК. Помимо исправления ошибок, очень важной характеристикой ДНК-полимераз является их термостабильность. Именно термостабильную ДНК-полимеразу впервые получили из термофильных бактерий и назвали Таq-полимераза. Таq-полимераза устойчива к высоким температурам и может выдерживать несколько циклов реакции. За счет этого использование полимеразы позволило упростить и автоматизировать проведение ПЦР [35].

## **1.8 Электрофорез**

Электрофорез – это процесс миграции электрически-заряженных частиц или ионов в растворах из-за приложенного электрического поля. Способность разделять очень похожие вещества, включая различные белки, для аналитических и препаративных целей возросла с 1950 года, благодаря введению зонного электрофореза в бумаге, а затем в гелях полиакриламида или агарозы. После 1960 года электрофорез с диском и смещением

(изотахофорез) и изоэлектрическая фокусировка позволили значительно увеличить разрешение. Электрофоретические методы в настоящее время способствуют достижениям в области биохимии и молекулярной биологии и будут по-прежнему иметь большое значение в науке и для многочисленных применений в области генетики, геномной технологии, секвенирования нуклеиновых кислот и белков, исследований заболеваний и сбоев, включая рак, например, в судебной медицине [36].

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 формирование 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 [37]. Микрофабрикатные (микроканальные) устройства являются относительно новыми; они разделяют фрагменты ДНК после комплексной обработки аналитов [38]. За последние 10 лет миниатюризация аналитических и биоаналитических инструментов быстро развивалась. К настоящему времени были представлены различные виды систем

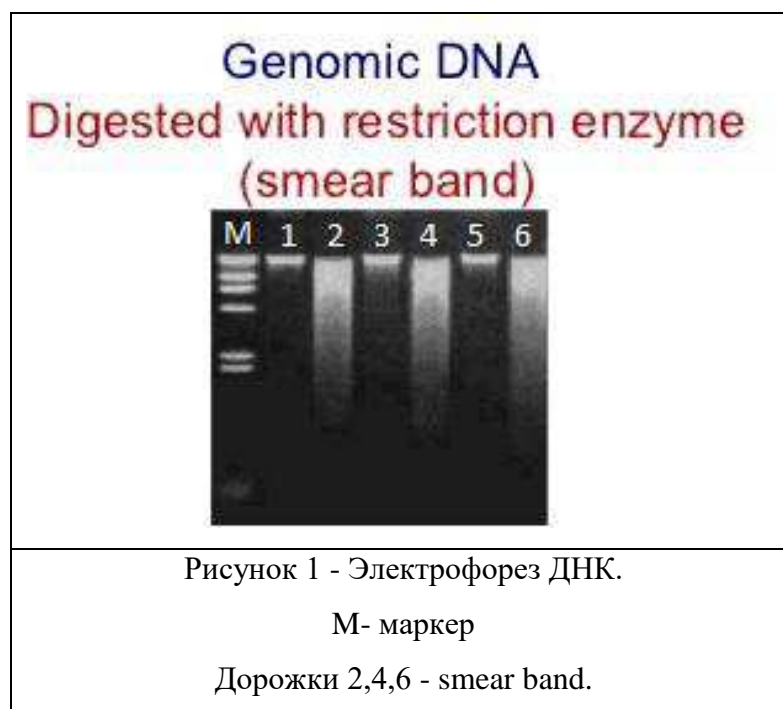


микротомального анализа ( $\mu\text{TAS}$ ), которые в различной степени применялись в практическом анализе. Среди них, электрофорез в микрочипах, который рассматривается как новая технология, обещающая произвести революцию в химическом анализе из-за его выдающихся преимуществ, таких как высокая эффективность, высокая производительность, простота в эксплуатации и низкое потребление образцов и реагентов [39].

Образцы ДНК загружают в лунки в агарозной гелевой среде. Напряжение подается на гель, вызывая миграцию ДНК к аноду из-за отрицательно заряженных фосфатов вдоль основной цепи ДНК. Гель окрашивают красителем, таким как бромид этидия, что позволяет визуализировать ДНК при просмотре в ультрафиолетовом (УФ) свете. Меньшие фрагменты ДНК мигрируют быстрее через матрицу геля, а более крупные фрагменты мигрируют медленнее. Молекулярная масса ДНК (пары оснований [bp]) определяет скорость миграции через гель и определяется по сравнению со стандартами (т.е. маркерами молекулярной массы) известных размеров, которые проходят параллельно на геле [40].

Электрофорез – это метод определения количества и качества ДНК. Данный метод определяет приблизительное количество ДНК. Она определяется сравнением исследуемой ДНК с ДНК-маркером с известной концентрацией. После электрофореза и окрашивания геля сравнивают интенсивность свечения полос ДНК в исследуемых и эталонных образцах.

В большинстве случаев электрофорез применяется для определения качества ДНК. При хорошем качестве образца ДНК полосы при электрофорезе будут ровные, четкие, без разводов и шмеров (Рис.1).



### 1.9 Рестриктный анализ ДНК

Эндонуклеазы рестрикции представляют собой дезоксирибонуклеазы, которые расщепляют двухцепочечную ДНК на фрагменты. Рестриктазы катализируют гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных молекул ДНК в бактериях и в некоторых других организмах, выполняя тем самым защитную функцию.

В середине двадцатого века было показано, что инфекционность бактериофага может быть определена штаммом-хозяина, в котором он размножается. Было показано, что общей основой этого «контролируемого хозяином» эффекта является модификация ДНК путем метилирования определенных оснований в последовательностях-мишенях. В отсутствие этой штамм-специфической модификации, ДНК может быть распознана как чужеродная и расщепленная резидентной эндонуклеазой рестрикции. 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. Вместе рестрикционные эндонуклеазы и их родственные метилтрансферазы составляют классические системы рестрикции-модификации (RM) (типы I-III). Но некоторые эндонуклеазы рестрикции (тип IV) разрезали ДНК только тогда, когда последовательности-мишени модифицированы.

Эндонуклеазы рестрикции были фундаментальными для развития молекулярной биологии, в частности, благодаря их применению для клонирования генов и секвенирования ДНК. Достигнуто значительное понимание молекулярных взаимодействий эндонуклеаз рестрикции и метилтрансфераз с ДНК. Разнообразная природа и обширное распределение систем RM в бактериях и археях повышает интерес к их биологической значимости для организмов, которые их определяют. Многие бактерии кодируют одну или две системы, некоторые содержат гены для более чем 20 различных систем, в то время как геномы других, часто внутриклеточных паразитов, не кодируют гомологи каких-либо известных ферментов рестрикции. Хотя распознавание немодифицированных последовательностей-мишеней может служить для защиты бактерий от фаговой инфекции, чужеродные фрагменты ДНК, полученные путем рестрикции, могут действовать в качестве субстратов для генетической рекомбинации *in vivo* и могут облегчать горизонтальный перенос генов [41].

Эндонуклеазы расщепляют ДНК в межнуклеосомных линкерных областях, что приводит к характерной «лестничной» схеме после электрофореза в агарозном геле [42]. Эти ферменты активируются как  $\text{Ca}^{2+}$ , так и  $\text{Mg}^{2+}$ . Отличие экзонуклеаз от эндонуклеазы рестрикции заключается в том, что эндонуклеазы расщепляют цепь ДНК не с конца молекулы, а в середине.

Фрагменты ДНК, полученные рестрикционным расщеплением рестриктаз II класса, можно разделить в гелях в соответствии с их молекулярной массой (короткие фрагменты перемещаются в геле намного быстрее, чем длинные). При высокой концентрации агарозы большие фрагменты не проходят в гель. При окрашивании этидиумом бромидом, который может связываться с молекулой ДНК, выявляется набор полос, каждая полоса отвечает рестрикционному фрагменту. Фрагменты могут быть выделены из геля и использованы для анализа последовательности для выяснения генетической информации, хранящейся в ДНК.

### **1.10 Рестрикционный анализ амплифицированной рибосомальной ДНК (метод ARDRA)**

Рестрикционный анализ амплифицированной рДНК. ARDRA, основанный на расщеплении рестрикционной эндонуклеазой амплифицированной бактериальной 16S рДНК, представляет собой генотипирование / риботипирование «отпечатков пальцев» на основе рДНК [43]. 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 [44].

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 [45].

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 [46].

Полиморфизм ДНК - это наличие вариабельности в последовательности нуклеотидов в одном и том же гене (выполняющем те же функции) у близкородственных видов.

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Используемые образцы биомассы почвенных бактерий**

Образцы непатогенных почвенных бактерий, использованные для выделения ДНК, были получены от сотрудницы кафедры биотехнологии Демьянчук Д.А. и высеяны мной на кафедре биотехнологии в октябре 2019 года.

### **2.2 Методика посева микроорганизмов на агаризованную среду**

Отбор клеток микроорганизмов, выращенных на плотной среде в пробирке, осуществляют следующим образом:

1. Пробирку с культурой беру так, чтобы поверхность питательной среды с налетом бактерий была обращена кверху и хорошо видна. Пробирку нужно держать в горизонтальном положении или под наклоном. Далее в правую руку взять петлю так, как держат ручку, и подержать в пламени горелки до красноты. Затем мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают ватную пробку к ладони, вынимают ее из пробирки и держат так во время следующих действий.
2. Края открытой пробирки с культурой бактерий обжигают в пламени горелки и после этого вводят в пробирку микробиологическую петлю (стерильную).
3. После взятия небольшого количества бактериальной массы с поверхности субстрата, вынимают петлю из пробирки, не касаясь ее стенок или краев.
4. Горлышко пробирки снова обжигают в пламени горелки, затем обжигают ватную пробку и закрывают ею пробирку.
5. Далее извлеченный материал используют для приготовления препарата, для пересева культуры в свежую среду.

6. Петлю вводят в пробирку до конца и, слегка касаясь ею поверхности агара, проводят снизу вверх либо зигзагообразную, либо прямую черту – штрих. При этом стараются не повредить поверхность плотной среды.
7. Оставшиеся на петле после пересева клетки бактерий тщательно сжигают в пламени горелки.

Изложенные выше манипуляции необходимо проводить около пламени горелки, но не в пламени, по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не следует делать резких движений и ходить около работающего с чистой культурой, так как движение воздуха увеличивает вероятность случайного ее загрязнения.

После пересевов пробирки, в которых выращивают бактерии, помещают в термостаты, где с помощью терморегуляторов поддерживается постоянная температура.

### **2.3 Методика выделения ДНК**

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

Максимальный выход бактериальной ДНК достигается с помощью суспендирования биомассы бактерий в специальном лизисном буфере G-A (идет в наборе) [47].

#### **Ход работы:**

1. Беру  $1 \times 10^9$  бактерий в 2 мл. пробирку для микроцентрифугирования (идет в наборе). Откручиваю на центрифуге на максимальной скорости 12000 оборотов в течение 30 секунд. Удаляю супернатант и ресуспендирую бактериальный осадок в 150 мкл буфера S, содержащий РНК-азу А.

2. Добавляю 20 мкл лизоцима и хорошо перемешиваю. Держим при комнатной температуре в течение 5 минут.

**Примечание.** При использовании грамположительных бактерий инкубировать при 37 ° C в течение 30 минут после добавления лизоцима.

3. Добавить 30 мкл 0,25 М ЭДТА (рН 8,0). Хорошо перемешать на вортексе и инкубировать в холоде в течение 5 минут.

4. Добавить 450 мкл буфера G-A и встряхнуть на вортексе в течение 15 секунд. Нагреть на водяной бане при температуре 65 ° C в течение 10 минут.

5. Добавить 400 мкл буфера G-B, а затем 1 мл буфера DV (предварительно охлажденного до 4 ° C). Перемешать на центрифуге при 12000 оборотов в течение 2 минут.

6. Забираю как можно больше надосадочной жидкости, не нарушая интерфазу. Верхнюю фазу отбрасываю.

7. Добавляю 1 мл буфера DV (предварительно охлажденного до 4 ° C) к оставшимся средней и нижней фазам. Встряхиваю на вортексе для достижения гомогенности. Далее откручиваем на центрифуге при 12000 оборотах в течение 2 минут.

8. Отбрасываю цветную верхнюю фазу. Переношу нижнюю фазу на спин-фильтр, помещенный в 2 мл пробирку для микрофугирования (прилагается) и центрифугируем при 12000 оборотах в течение 1 минуты.

9. Выбрасываю Spin-фильтр. В пробирку добавляем 400 мкл буфера BV к фильтрату и хорошо перемешиваем.

10. Помещаю колонку Miniprep в пробирку для микроцентрифугирования объемом 2 мл (прилагается). Переношу связующую смесь из Step 9 к колонке Miniprep. Центрифугируем при 12000 оборотах в течение 1 минуты.

11. Убираю фильтрат из пробирки для микроцентрифугирования 2 мл. Помещаю колонку Miniprep обратно в 2 мл микроцентрифужную пробирку. Добавляю 500 мкл буфера W1 в колонку Miniprep и центрифугирую при



12000 оборотах в течение 1 минуты.

12. Отбрасываю фильтрат и помещаю колонку Miniprep обратно в пробирку для микроцентрифугирования 2 мл. Добавляем 700 мкл Буфера W2 и центрифугирую при 12000 оборотах в течение 1 минуты. Повторю этот шаг очистки со вторым 700 мкл Аликвота Буфера W2.

13. Убираю фильтр. Помещаю колонку Miniprep обратно в 2 мл микроцентрифужную пробирку. Центрифугирую при 12000 оборотах в течение 1 минуты.

14. Переношу колонку Miniprep в чистую 1,5 мл пробирку для микроцентрифуги (прилагается). Чтобы элюировать ДНК, добавляю 100-200 мкл деионизированной воды или элюента к центру мембраны. Инкубирую 1 минуту при комнатной температуре. Центрифугируем при 12000 оборотах в течение 1 минуты.

**Примечание.** Предварительное нагревание воды или элюента при температуре 65 ° C часто повышает эффективность элюирования.

## **2.4 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 электрофореза (гель 7x10) Mini-SubCellGT, Bio-Rad.
3. Гель-документирующая система Bio-Rad GelDocXR с компьютером.

### **Ход работы:**

1. Добавить нужное количество порошка агарозы (0,75 г) в рассчитанный объем электрофорезного буфера (50 мл).

2. Нагреть взвесь в микроволновой печи до тех пор, пока агароза не образует равномерную суспензию. Суспензию довести до начала кипения, затем осторожно удалить из микроволновой печи и охладить до 70<sup>0</sup> С.
3. Залить полученную суспензию в форму для агарозы.
4. Установить гребенку в форму для агарозы. Необходимо, чтобы между дном лунки от гребенки и основанием геля оставался слой агарозы толщиной 0,5-1,0 мм.
5. После того как гель полностью затвердел (через 20-30 мин.), удалить гребенку и поместить гель в электрофорезную кювету.
6. Добавить достаточное количество электрофорезного буфера.
7. Смешать пробы ДНК с буфером для нанесения, содержащим глицерин и красители (бромфеноловый) в соотношении 5:1.
8. С помощью автоматической микропипетки внести смесь в лунки геля под электрофорезный буфер.
9. Подсоединить электроды к источнику напряжения. Напряженность при проведении разделения в агарозных гелях составляет 50 V. Красители, как и ДНК, перемещаются к аноду. Бромфеноловый синий передвигается со скоростью равной скорости фрагмента ДНК из 900 пар оснований.
10. По окончании разделения вынуть подложку с гелем из кюветы и поместить гель в красящий раствор (1 мкг/мл этидиум бромид). После 20 мин. прокрашивания вынуть гель и промыть в воде в течение 2 мин.
11. Удалить лишнюю жидкость и переложить гель в камеру трансиллюминатора гель-документирующей системы.
12. Рассмотреть гель в проходящем ультрафиолетовом свете. Зафиксировать полученное изображение и оформить результаты, используя гель-документирующую систему.

## 2.5 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 (1350 R - 500 L; 8F – 1492L)
- 3 мкл MgCl<sub>2</sub> с 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 пар оснований и 1500 пар оснований.

Используемая программа при проведении ПЦР:

1. 94<sup>0</sup>C – 3:00 мин.
2. 80<sup>0</sup>C – 0:40 сек
3. 95<sup>0</sup>C – 0:10 сек.
4. 62<sup>0</sup>C – 0:20 сек.
5. 72<sup>0</sup>C – 1:40 мин. ( 1:00 мин. для ампликонов 1350 R - 500 L)
6. Go to 3:35 times
7. 72<sup>0</sup>C for 10: 00 мин.
8. 4<sup>0</sup>C – 18:00:00

## 2.6 Проведение реакции рестрикции

Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 2 ч. в приборе Thermomixer comfort производство фирмы Eppendorf. Реакция проходила при 37 °С (для рестриктазы Rsa I); 65 °С (для рестриктазы Tru9 I) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 ед. акт. рестриктазы.

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

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

Все вещества смешали 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 электрофорез.

## 2.7 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 [42].

Был проведен рестрикционный анализ *in silico* ампликонов их генов 16S-рРНК с помощью программы pDRAW32. После теоретического рестриктирования ампликонов последовательностей 8F-1492R взятых из базы данных GenBank [43] для каждого вида были построены рестрикционные профили.

### **3 Результаты**

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности со страницы 31 по 39, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе я оптимизировала процедуру выделения ДНК из разных видов бактерий. Было подобрано оптимальное время инкубации с лизоцимом для грамотрицательных бактерий. Выяснила, что клеточную стенку грамположительных бактерий рода *Bacillus* разрушить сложнее в сравнении с другими грамположительными бактериями, что мы и можем увидеть по меньшей концентрации ДНК среди препаратов выделенной ДНК.

Использовала полученные образцы ДНК для получения ампликонов гена 16S рРНК и провела гель-электрофорез полученных ампликонов гена 16S рРНК с целью проверки их качества. Масса всех полученных ампликонов составила около 1500 п.о., что свидетельствовало об успешном проведении ПЦР.

Провела рестрикцию полученных ампликонов и гель-электрофорез полученных рестриктов с маркерами в агарозном геле для пополнения нашей базы данных экспериментальных электрофореграмм. Задokumentировала полученные результаты с помощью гель-документирующей системы.

Таким образом были получены экспериментальные электрофореграммы следующих видов бактерий: *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas kilonensis*, *Arthrobacter aurescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Bacillus pumilus*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*.

Используя базу данных GenBank, построила виртуальные электрофореграммы ряда видов бактерий и сравнила их с полученными экспериментально. Сравнение теоретических и практических электрофореграмм показало хорошее совпадение. Оно также позволило уточнить данные о видовом составе образцов почвенных бактерий, полученные ранее методом масс спектроскопии.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BSA - бычий сывороточный альбумин

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

п.о. - пары оснований

bp - base pairs

БАВ - биологически активные вещества

дТТФ – дезокситимидин трифосфат

дГТФ – дезоксигуанозин трифосфат

дЦТФ – дезоксицитидин трифосфат

дАТФ – дезоксиаденозин трифосфат

dNTPs – дезоксинуклеозид трифосфаты

*E. coli* – *Escherichia coli*



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Woo, P.C.Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories / P.C.Y. Woo, S.K.P.Lau, J.L.L.Tengc, H.Tse, K.-Y.Yuen // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2008. – V.14, I. 10. – P. 908-934.
2. Березов, Т.Т. Биологическая химия: учебное пособие / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин – Москва: Медицина, 2004. – 704 с.
3. 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.
4. Николаев, А. Я. Биологическая химия: учебное пособие / А. Я. Николаев. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2007. – 589 с.
5. Spiegel, J. The Structure and Function of DNA G-Quadruplexes / J.Spiegel, S.Adhikari, S.Balasubramanian // *Trends in Chemistry*. – 2020. –V. 2, –I. 2. –P. 123-136.
6. Hagedorn, P.H. Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery / P.H.Hagedorn, R.Persson, E. D.Funder, N.Albæk, S. L.Diemer, D.J.Hansen // *Drug Discovery Today*. –2020. –V. 23, –I. 1. –P. 101-114.
7. Dahm, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA / R. Dahm // *Developmental Biology*. – 2005. – № 2. – P. 276.
8. Watson, J. D. Molecular structure of nucleic acids / J. D. Watson, F. H. C. Crick // *Nature*. –1959. –V. 171. –P. 346.
9. Pal, C. An integrated view of protein evolution / C. Pal, B. Papp, M. Lercher // *Nat Rev Genet*. –2006. – № 7. – P. 337–348.
10. Концевая, И. И. Микробиология : генетические механизмы изменчивости у бактерий / И. И. Концевая. – Чернигов: Десна Полиграф, 2017. – 36 с.

11. Патрушев, Л. И. Экспрессия генов: монография / Л. И. Патрушев. – Москва: Наука, 2000. – 830 с.
12. Badrinarayanan, A. Bacterial Chromosome Organization and Segregation / A. Badrinarayanan, T. В.К. Le, M.T. Laub // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. –2015. –V. 31. –P. 171-199.
13. Patiño-Navarrete, R. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria / R.Patiño-Navarrete, V. Sanchis // *Research in Microbiology*. – 2017. –V.168, –I. 4. –P. 309-318.
14. Патрушев, Л. И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. – Москва: Наука, 2004. – 530 с.
15. Попова, Н. А. Введение в биологию : учебное пособие / Н. А. Попова. – Новосибирск : НГУ, 2012. – 270 с.
16. Квитко, К. В. Генетика микроорганизмов: учебное пособие / К. В. Квитко, И.А. Захаров. – Санкт Петербург: Изд. дом СПб. ун-та, 2012. – 268 с.
17. Khan, A. Quantifying the forces that maintain prophages in bacterial genomes / A. Khan, L. M. Wahl // *Theoretical Population Biology*. –2020. –V. 133. –P. 168-179.
18. 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.
19. KIM, S. Y. Effects of prophage regions in a plasmid carrying a carbapenemase gene on survival against antibiotic stress / S. Y. KIM, K. K. Soo // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2019. –V. 53, –I. 1. – P. 89-94.
20. Chakravorty, S. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria / S. Chakravorty, D. Helb, M.

- Burday, N. Connell, D. Alland // *Journal of Microbiological Methods*. – 2007. –V. 69, –I. 2. –P. 330-339.
21. 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.
22. Claesson, M. J. Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine / M. J. Claesson, O. O’Sullivan, Q. Wang, J. Nikkila, J. R. Marchesi, H. Smidt, W. M. de Vos, R. P. Ross // *PLoS ONE*. – 2009. –V. 4, –I. 8. –P. 6669.
23. Ларин, А. К. Определение микробной флоры пигментных желчных камней на основе анализа гена 16S рибосомальной РНК / А. К. Ларин, П. Л. Щербаков, Л. А. Харитонова, О. Н. Царькова, К. Т. Момыналиев // *РЖГГК*. – 2009. – Т. 19, № 5. – С. 49–54.
24. Cama, J. Breaching the Barrier: Quantifying Antibiotic Permeability across Gram-negative Bacterial Membranes / J. Cama, A. M. Henney, M. Winterhalter // *Journal of Molecular Biology*. – 2019. –V. 431, -I. 18. –P. 3531-3546.
25. Auda, I. G. Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief / I. G. Auda, I. M. Ali Salman, J. Gh. Odah // *Gene Reports*. – 2020. –V. 20. –P.100666.
26. Mitra, S. D. Right Place, Right Time: Focalization of Membrane Proteins in Gram-Positive Bacteria / S. D. Mitra, I. Afonina, K. A. Kline // *Trends in Microbiology*. – 2016. –V. 24, -I. 8. –P. 611-62.
27. Sohrabi, M. The yield and quality of cellular and bacterial DNA extracts from human oral rinse samples are variably affected by the cell lysis methodology / M. Sohrabi, R.G. Nair, L. P. Samaranayake, L. Zhang, A. H. Md.Zulfiker, A. Ahmetagic, D. Gooda, M.Q. Wei // *Journal of Microbiological Methods*. -2016. –V. 122. –P. 64-72

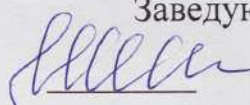
28. Nair, H. P. Evaluation of five in situ lysis protocols for PCR amenable metagenomic DNA from mangrove soils / H. P. Nair, H. Vincent, S. G. Bhat // *Biotechnology Reports*. –2014. –V. 4. –P. 134-138.
29. Yang, Y. Specific and effective detection of anammox bacteria using PCR primers targeting the 16S rRNA gene and functional genes / Y. Yang, M. Li, H. Li, X. Li, J. Line, M. Deneck, J. Gu // *Science of The Total Environment*. –2020. –V. 734. –P. 139387.
30. Ребриков, Д. В. ПЦР в реальном времени: учебник / Д. В. Ребриков, Д. В. Саматов, Д. Ю. Трофимов. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
31. Schochetman, G. Polymerase chain reaction / G. Schochetman, C.-Y. Ou, W.K. Jones // *Journal of Infectious Diseases*. –1988. –V. 158, –I. 6. –P. 1154-1157.
32. Garibyan, L. Polymerase Chain Reaction / L. Garibyan, N. Avashia // *Journal of Investigative Dermatology*. –2013. –V. 133, –I. 3. –P. 1-4.
33. Walker, J. M. PCR Protocols / J. M Walker, D. Stirling // *Methods in molecular biology*. –2003. –V. 226. –P. 405-425.
34. Полимеразная цепная реакция [Электронный ресурс] – Режим доступа: [[http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o\\_pass/MMoB/10.pdf](http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o_pass/MMoB/10.pdf)]
35. 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.
36. Coulther, T. A. Engineering Polymerases for New Functions / T. A. Coulther, H. R. Stern, P. J. Beuning // *Trends in Biotechnology*. –2019. –V. 37, –I. 10. –P. 1091-1103.
37. SibEnzyme [Электронный ресурс] – Режим доступа: [<http://russia.sibenzyme.com/products/restrictases>]

38. Vesterberg, O. History of electrophoretic methods / O. Vesterberg // Journal of Chromatography A. -1989. –V. 480. –P. 3-19.
39. Поляничко, А. М. Электрофорез в агарозном геле: учебно-методическое пособие / А. М. Поляничко – Москва : Наука, 2007. – 157 с.
40. Hollister, E. B. Chapter 13 - Nucleic Acid-Based Methods of Analysis / E. B. Hollister, J. P. Brooks, T. J. Gentry // Environmental Microbiology (Third edition). -2015. –P. 271-305.
41. Blakely, G. W. DNA Restriction and Modification / G. W. Blakely, N. E. Murray // Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). -2009. –P. 538-549.
42. Lash, L. H. 7.04 - Mechanisms of Toxicant-Induced Acute Kidney Injury / L. H. Lash, B. S. Cummings // Comprehensive Toxicology (Second Edition). - 2010. –V. 7. –P. 81-115.
43. Nazir, R. Chapter 7 - Exploring bacterial diversity: from cell to sequence / R. Nazir, S. Rehman, M. Nisa, U. a. Baba // Freshwater Microbiology Perspectives of Bacterial Dynamics in Lake Ecosystems. -2019. –P. 263-306.
44. Panigrahi, S. Chapter 21 - Functional Microbial Diversity in Contaminated Environment and Application in Bioremediation / S. Panigrahi, P. Velraj, T. S. Rao // Microbial Diversity in the Genomic Era. -2019. –P. 359-385.
45. Chatterjee, S. Chapter 32 - Pathogenic Microbial Genetic Diversity with Reference to Health / S. Chatterjee, I. H. Raval // Microbial Diversity in the Genomic Era. -2019. –P. 559-577.
46. Hoy, M. A. Chapter 13 - Insect Population Ecology and Molecular Genetics / M. A. Hoy // Insect Molecular Genetics (Fourth Edition). -2019. –P. 515-561.
47. АхуPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit [Электронный ресурс] – Режим доступа:  
[<https://www.gzsuyan.com/Upload/Product/201508141007437619.pdf>].

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е. И. Шишацкая

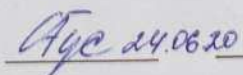
«25» июня 2020 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

«Выделение и исследование ДНК бактерий»

Научный руководитель

 доцент, к.б.н.

О. А. Гусейнов

Выпускник

 24.06.20

А.О. Холощенко

Красноярск 2020