

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Е. И. Шишакца
подпись инициалы, фамилия
« » 20 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

«Определение видов бактерий современными методами»

06.04.01 - Биология
06.04.01.05 - Реконструктивная Биоинженерия

Научный руководитель	<u> </u> подпись, дата	<u> </u> <u>доцент, к.б.н</u> должность, ученая степень	<u>О.А.Гусейнов</u> инициалы, фамилия
Выпускник	<u> </u> подпись, дата		<u>Н.С.Арестова</u> инициалы, фамилия
Рецензент	<u> </u> подпись, дата	<u> </u> <u>доцент, к.б.н</u> должность, ученая степень	<u>Л. С. Смирнова</u> инициалы, фамилия

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме "Определение видов бактерий современными методами" содержит 63 страницы текстового документа, 21 иллюстрацию, 4 таблицы, 56 использованных источников.

Ключевые слова: 16S рРНК, ARDRA, идентификация бактерий, метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Цель работы: Выявить сходства и различия электрофореграмм для метода ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) с использованием рестриктаз *NotI*, *MspI*, *FatI* для ряда образцов бактерий.

Задачи исследования:

1. Построить теоретические электрофореграммы для ряда бактерий с использованием рестриктаз *NotI*, *MspI*, *FatI* методом ARDRA.
2. Выделить ДНК из ряда образцов бактерий.
3. Получить ампликоны гена 16S рРНК образцов бактерий.
4. Провести гидролиз полученных ампликонов с использованием рестриктаз *NotI*, *MspI*, *FatI* и провести электрофорез продуктов гидролиза.
5. Проанализировать полученные результаты электрофореза и сравнить практические и теоретические результаты.

При использовании базы данных GenBank, были построены теоретические электрофореграммы для ряда бактерий с использованием рестриктаз *NotI*, *MspI*, *FatI* методом ARDRA.

Выделены препараты ДНК из ряда бактерий, получены ампликоны размером около 1500 п.о. гена 16S рРНК.

Проведен гидролиз полученных ампликонов и электрофорез продуктов гидролиза.

Полученные данные были сверены с результатами анализа *in silico* и результатами секвенирования.

По результатам исследованные образцы оказались представителями видов: *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Arthrobacter aurescens*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Bacillus atrophaeus*, *Arthrobacter globiformis*.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Домен Bacteria и домен Archaea.....	6
1.2 Ген 16S рРНК.....	11
1.3 Полимеразная цепная реакция.....	12
1.4 Компоненты, которые необходимы для проведения реакции амплификации.....	13
1.5 Процесс амплификации.....	144
1.6 Модификации ПЦР.....	16
1.6.1 Hot-start ПЦР.....	166
1.6.2 ПЦР с применением обратной транскриптазы.....	177
1.6.3 End-point полимеразная цепная реакция.....	177
1.6.4 Real-Time полимеразная цепная реакция.....	18
1.6.5 Multiplex полимеразная цепная реакция.....	199
1.6.6 Инвертированный метод ПЦР.....	19
1.6.7 Long-range полимеразная цепная реакция.....	20
1.7 Электорофоретическое разделение фрагментов ДНК в агарозном геле.....	200
1.8 Методика вертикального гель-электрофореза.....	22
1.9 Restriction fragment length polymorphism.....	233
1.10 Секвенирование нового поколения.....	24
1.11 Основные постулаты NGS.....	24
1.12 Применение секвенирования нового поколения.....	25
1.13 Негенетические методы идентификации микроорганизмов.....	26

1.14 Ручные методы идентификации бактерий.....	26
1.14.1 Виды ручных тест-систем	27
1.14.2 Система индикаторных бумажек.....	27
1.14.3 Антигенная структура как основа для иммуномагнитной дифференцировки.....	28
1.15 Хроматографические методы	28
1.16 Метод микрокалориметрии.....	29
1.17 Серологический метод.....	30
1.18 MALDI-TOF методика.....	31
1.19 Определение видовой принадлежности микроорганизмов при помощи биохимических методов	32
1.20 Автоматические системы идентификации бактерий.....	33
1.20.1 Система MICROSCAN.....	33
1.20.2 Система VITEK	33
1.20.3 Анализ микроорганизмов <i>in silico</i>	35
1.21 Традиционные методы бактериологического анализа.....	35
1.22 Недостатки традиционных методов бактериологического анализа	35
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	36
2.1 Методика теоретического применения ARDRA.....	36
2.2 Методика проведения электрофореза.....	38
2.3 Методика очистки ампликонов.....	40
2.4 Проведение ПЦР.....	41
2.6 Проведение реакции рестрикции.....	42
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	43
3.1 Результаты анализов <i>in silico</i>	43

3.2	Определение концентрации и качества полученных образцов ДНК.....	45
3.3	Получение ампликонов гена 16S рРНК.....	46
3.4.1	Сравнительный анализ рестриктов ампликона 8L – 1492R после рестрикции ферментом Hae III.....	48
3.4.2	Сравнительный анализ рестриктов ампликона 8L – 1492R после рестрикции ферментом Msp I.....	49
3.4.3	Сравнительный анализ рестриктов ампликона 8L – 1492R после рестрикции ферментом Fat I.....	52
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	54
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	55
	SUMMARY.....	56
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	57

ВВЕДЕНИЕ

В современной биотехнологии и медицине широко используются свойства микроорганизмов. Микроорганизмы могут обладать полезными для человека свойствами, могут быть и патогенными. Поэтому очень важно уметь их правильно идентифицировать.

Помимо классических методик идентификации бактерий с помощью культуральных и морфологических характеристик, а также химических и биохимических реакций, всё чаще применяются методы идентификации, основанные на изучении ДНК [1].

Метод ARDRA (рестрикционный анализ ампликонов гена 16S рРНК) является одним из менее затратных и скорых методов идентификации бактерий. Метод ARDRA дает результат в течение дня.

ДНК является стержневым объектом изучения в молекулярной биологии и биохимии. Для разделения, идентификации и очистки ДНК употребляют метод электрофореза в агарозном геле [2].

Цель работы:

Выявить сходства и различия электрофореграмм для метода ARDRA с использованием рестриктаз *NotI*, *MspI*, *FatI* для ряда образцов бактерий.

Задачи:

1. Построить теоретические электрофореграммы для ряда бактерий с использованием рестриктаз *NotI*, *MspI*, *FatI* методом ARDRA.
2. Выделить ДНК из ряда образцов бактерий.
3. Получить ампликоны гена 16S рРНК образцов бактерий.
4. Провести гидролиз полученных ампликонов рестриктазами *NotI*, *MspI*, *FatI* и провести электрофорез продуктов гидролиза.
5. Проанализировать экспериментально полученные результаты электрофореза и сравнить практические и теоретические результаты.

Работа была проведена на базе центра коллективного пользования приборов ИФБиТ СФУ, г. Красноярск.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Домен *Bacteria* и домен *Archaea*

Бактерии, равно как и археи, являются прокариотическими микроорганизмами. Их размеры стандартно не превышают нескольких микрометров.

Представители домена *Bacteria* являются одними из древнейших живых организмов на планете Земля. Местом их обитания служат вода, земля, термальные гейзеры, зараженный радиацией мусор. Бактерии нередко могут выступать в качестве симбионтов для представителей других царств, в частности, животных и растений. Существуют и паразитические формы.

Человечеству известна лишь меньшая часть всех существующих бактерий. Их разнообразие огромно. На Земле существуют миллионы и миллиарды не описанных видов.

Бактерии способны разлагать органические вещества. Они запускают процесс разложения, участвуют в процессе фиксирования атмосферного N. Могут выживать в экстремальных условиях, даже на дне Марианского желоба, где нет ничего живого. Обитают в ЖКТ человека, на коже. Играют важнейшую роль в формировании иммунитета.

Прокариоты, в отличие от эукариот, не имеют в своем составе ядра. Это является важнейшим таксономическим признаком. ДНК бактерий — кольцо. Генетический аппарат клетки не содержит интронов, но встречаются редкие исключения.

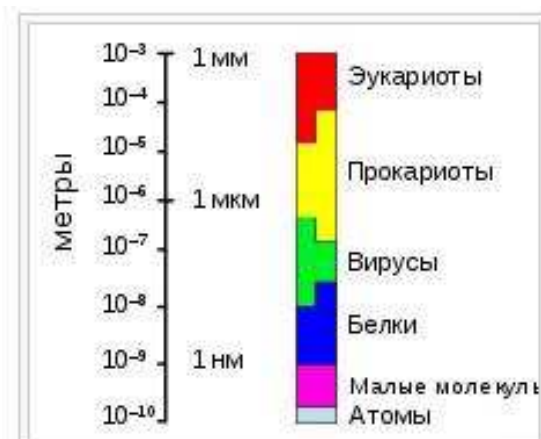


Рисунок 1 — Место прокариот в общей градации размеров живых организмов и биомолекул

Еще одним важным таксономическим признаком является наличие фосфолипидной клеточной мембраны.

По способу питания бактерии традиционно подразделяются на:

- Фототрофов. Способны получать энергию за счет солнца.
- Литотрофов. Получают энергию из неорганических соединений.
- Органотрофов. Питаются, разлагая органические вещества.

Бактерии могут выступать в качестве патогенов. Становятся причиной тяжелейших заболеваний человека и животных. Бубонная чума, столбняк, гонорея, туберкулез — все эти болезни имеют бактериальную природу.



Рисунок 2 — *Bacteria* — возбудители инфекций

Домен *Archaea* является сравнительно молодым. Он включает в себя микроорганизмы, которые подразделяются систематиками на филумы: *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* и *Korarchaeota* [3].

Представители *Euryarchaeota* обитают повсюду. Являются облигатными анаэробами. Этих архей можно обнаружить среди донных пресноводных отложений, богатых органическими соединениями. Так же средой обитания *Euryarchaeota* является желудочно-кишечный тракт жвачных животных.

Могут являться галофилами. Способны выживать в экстремальных условиях, в средах, отличающихся повышенным содержанием солей. Фотосинтез, свойственный галофилам, осуществляется при помощи бактериородопсина. Данный процесс работает подобно протонной помпе [3].

Crenarchaeota так же способны выживать в экстремальных условиях. Ареал обитания чрезвычайно узок и труднодоступен. Живут в серных соединениях при зашкаливающих значениях pH и температуры.

Представителей филума *Korarchaeota* человек культивировать, в настоящий момент, не способен. Однако ученым удалось расшифровать нуклеотидные последовательности, характерные для этих архей [4].

Домен *Archaea* отличается строением молекулы 16S рРНК.

Archaea так же отличается от представителей доменов *Bacteria* и *Eukaryota* множеством существенных признаков:

— В мембранах и мембранных липидах представителей *Archaea*, глицерол связан простой эфирной связью с фитанолом (спирт). В обыкновенных липидах присутствуют сложноэфирные взаимодействия глицерола с ЖК. Липиды способны принимать тетрамерную конфигурацию. В своем составе могут содержать кольца, состоящие из пяти членов.

Тетрамерные мембраны отличаются высокой ригидностью. Это связано с тем, что такие мембраны, как правило, характеризуются отсутствием внутреннего пространства.

Наряду с монослойными мембранами *Archaea* могут обладать так же и бислойными мембранами. То или иное строение зависит от условий, в которых обитает бактерия. Чем они экстремальнее, тем ригиднее становится клеточная оболочка.

— *Archaea* могут содержать в своих мембранах от семи до тридцати процентов сквалена (это соединение относится к группе изопренодов). Изопреноиды в составе клеточной стенки — характерный маркер древности. Встречается у тех архей, что обитают в нефтяных месторождениях.

— В клеточных стенках *Archaea* отсутствуют пептидогликаны.

В клеточной стенке находится либо псевдомуреин, лишенный N-ацетилмурамовой к-ты, либо слой структурированных белков, состоящих из «кислых» АК. Такие аминокислоты принимают участие в формировании тонкого слоя, который отталкивает от клеточной поверхности ионы солей.

Возможно так же и полное отсутствие какой бы то ни было клеточной стенки. Ее заменяет тетрамерный монослой. Такими археями являются *Thermoplasma*.

— В отличие от *Bacteria*, ДНК *Archaea* связана с белками-гистонами. Это роднит их с представителями домена *Eukaryota*. Присутствуют интроны. ТРНК не содержит в своем составе риботимин. Субъединицы РНК-полимераз архей сходны с полимеразами *Eukaryota*.

— *Archaea* способны выживать в экстремальных условиях, где отсутствует конкурентная борьба. Именно благодаря этому представители данного домена сумели дожить до наших дней [5].

1.2 Ген 16S рРНК

Ген 16S рРНК является инструментом филогенетической систематики.

Данный ген состоит из полутора тысяч п. о., около девятисот из них имеют устойчивость к мутациям. Это дает возможность сравнивать нуклеотидные последовательности данного гена, принадлежащие различным бактериям, между собой [6].

Молекулу 16S рРНК принято называть генным «хронометром». Информации, заключенной в ней, достаточно для видовой идентификации микроорганизмов. Компьютерные технологии позволили построить филогенетическое древо, основанное на огромном количестве проанализированной информации.

Благодаря генетическим исследованиям, родилась теория о том, что происхождение хлоропластов и митохондрий является результатом бактериального симбиоза.

Изучения гена 16S рРНК делает возможным филогенетическую идентификацию микроорганизмов. Девяностопроцентное совпадение свидетельствует о родовой принадлежности, а девяностосемипроцентное — позволяет определить вид исследуемого микроорганизма [7].

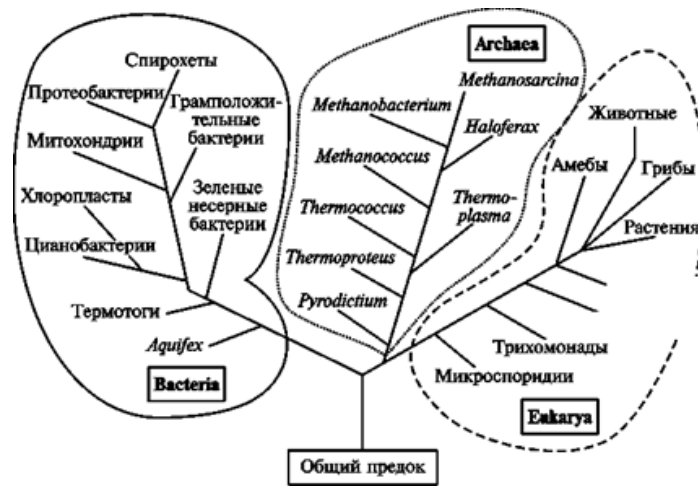


Рисунок 3 – Анализ 16S рРНК позволил ученым воспроизвести филогенетическое древо

1.3 Полимеразная цепная реакция

В ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) происходит наработка ампликонов исследуемой ДНК. В этом процессе участвует фермент — ДНК-полимераза.

ПЦР состоит из нескольких циклов. Продукты, наработанные в предыдущем цикле, служат матрицей для следующих.

В процессе ПЦР амплифицируется исключительно тот участок ДНК, который удовлетворяет заданным условиям реакции. Для этого необходимо, чтобы исследуемый участок присутствовал в пробе [8].

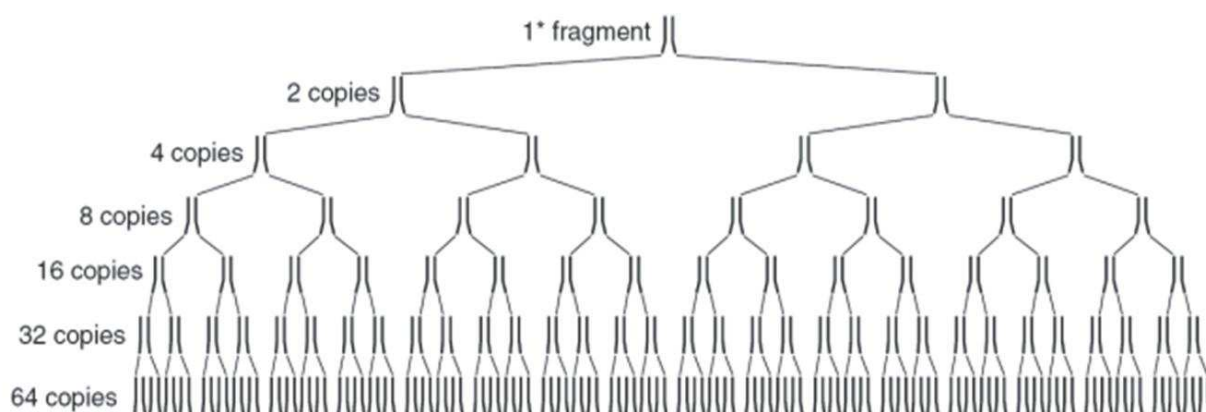


Рисунок 4 — Полимеразная цепная реакция

Репликация, происходящая в живых клетках, способна реплицировать всю ДНК. Полимеразная цепная реакция призвана создавать ампликоны довольно ограниченных фрагментов цепей ДНК (они традиционно не превышают трех тысяч п.о. (три kbp).

1.4 Компоненты, которые необходимы для проведения реакции амплификации

1. *Праймеры.* Представляют собой небольшие (десять-двадцать нуклеотидов) неспаренные цепочки ДНК. Являются комплементарными к определенному участку исследуемой ДНК.

Праймеры необходимы для запуска главного фермента ПЦР — ДНК-полимеразы.

Пара праймеров призвана ограничить исследуемую нуклеотидную последовательность спереди и сзади. F (forward) праймер соответствует нуклеотидам на 5'-3' цепи ДНК, а R (reverse) праймер комплементарен обратной (3'-5') цепи [8].

Главное, что нужно учесть при выборе праймера — это температура плавления (T_m) комплекса праймер-матрица. Если подобран неверный

праймер, то полимеразная цепная реакция попросту не начнется. ДНК-матрица не сможет связаться с затравками.

В случае если для реакции ПЦР будет выбран неправильный праймер, это приведет к созданию неспецифических продуктов амплификации из-за участков, частично комплементарных другим регионам матричной цепи ДНК.

Важнейшие критерии подбора праймеров:

— Содержание гуанина и цитозина должно варьировать в пределах сорока-шестидесяти процентов;

— Температура плавления праймеров не должна различаться больше чем на пять градусов;

— Присутствие в праймерах шпилек и димеров не допускается;

— Гуанин и цитозин способны создавать три водородные связи. Их присутствие на 3'-конце стабилизирует гибридизацию праймера с матричной цепью ДНК.

2. В ДНК-матрице должен присутствовать участок, который надлежит амплификации. Нередко в исследованиях амплифицируется вся геномная ДНК [8, 9].

3. Требуется термостабильная ДНК-полимераза. Она должна работать при высокой температуре достаточно долго.

В ПЦР традиционно используют ферменты, получаемые из термофилов.

4. Необходимы дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (так же обозначаемые как dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

5. Ионы Mg^{2+} .

6. Буферный раствор. Он отвечает за следующие условия: pH, ионную силу раствора. Используются Tris-HCl (обеспечивает неизменность pH в пробе), ПАВ, органические соли [9].

1.5 Процесс амплификации

1. Денатурация. ДНК-матрица, которая состоит из двух цепей, подвергается воздействию высоких температур (94-96°C) на протяжении 0,5-2 минут. Это приводит к расхождению цепей ДНК. Водородные связи исчезают. Перед первым циклом амплификации полагается прогревать реакционную смесь на протяжении длительного времени (в течение двух-пяти минут). Это позволяет добиться полной денатурации ДНК-матрицы и затравок [10].

2. Отжиг. После того, как цепи денатурировали, температуру в амплификаторе снижают. Понижение температуры позволяет образовать связи между одноцепочечной матрицей и праймерами. В случае если отжиг праймеров производится при слишком высокой или слишком низкой температуре, комплекс праймер-матрица свяжется слабо, либо образуются неспецифические компоненты. Отжиг производится на протяжении тридцати или сорока пяти секунд [10].

3. Элонгация. На этом этапе температура должна возвратиться к оптимуму, необходимому для работы термостабильной ДНК-полимеразы, которая присутствует в реакционной смеси (семьдесят-семьдесят пять градусов Цельсия). По мере работы энзима, к праймеру подсоединяются нуклеотиды в нужной последовательности. Из мономеров, содержащихся в реакционной смеси образуется вторая цепь. Первая выступает в качестве матрицы [10].

Температурный профиль этапа элонгации определяется термостабильной полимеразой.

Если в реакционной смеси присутствуют Taq и Pfu полимеразы, то смесь разогревают до семидесяти двух градусов. При этой температуре данные энзимы проявляют свою наибольшую активность.

Время элонгации зависит от длины матрицы. Полимераза способна синтезировать тысячу пар оснований за 1 минуту.

По завершении циклов полагается сделать дополнительную элонгацию. Во время нее одноцепочечные фрагменты достраиваются. Данный этап занимает семь-десять минут.

После этого, температуру в амплификаторе вновь повышают до девяносто четырех градусов. Двойные цепи ДНК диссоциируют [11].

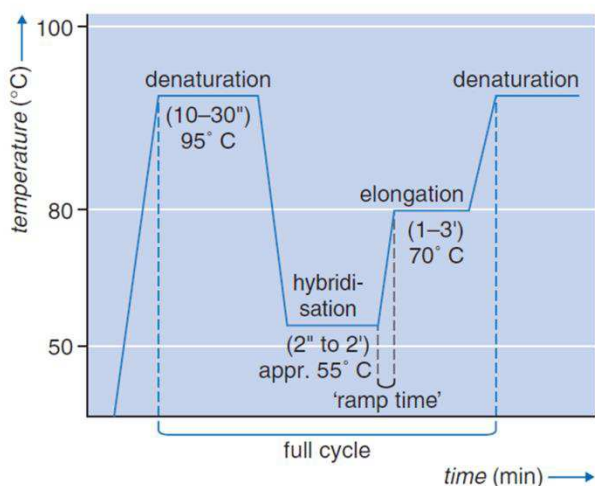


Рисунок 5 — Изменение температуры в типичном цикле ПЦР

1.6 Модификации ПЦР

1.6.1 Hot-start ПЦР

При использовании данной модификации становится невозможным преждевременное начало реакции. В пробирке с пробой создаются идеальные условия, которые необходимы для проведения специфического отжига [12].

При «горячем» старте активность энзима в момент постановки полимеразной цепной реакции ингибируется с помощью АТ. Либо с помощью «ложных» антител, которые представляют собой молекулы типа Affibody. Ингибирование держится до момента первой денатурации (при девяносто пяти градусах в течение десяти минут).

Вместо антител можно использовать легкоплавкий парафин. Так же возможно применение специальных масел. Они способны на время изолировать энзим от реакционной смеси [12].

1.6.2 ПЦР с применением обратной транскриптазы

Такая модификация полимеразной цепной реакции применяется при работе с известной последовательностью РНК.

Используя ревертазу можно синтезировать одноцепочечные молекулы кДНК (комплиментарной ДНК). Матрицей выступает матричная РНК. Полученная кДНК применяется для постановки ПЦР.

Использование обратной транскриптазы требует особых условий. Этот энзим чрезвычайно чувствителен к изменению температурного режима. Сорок два градуса Цельсия являются пороговым значением

Однако данная проблема решается в случае применения термостабильного энзима, который будет активен при Mn^{2+} [13].

1.6.3 End-point полимеразная цепная реакция

Данная методика ПЦР сигнализирует о результатах реакции с помощью флуоресценции после амплификации. Это позволяет производить оценку наработанных продуктов, без открытия пробирки. В таком случае не происходит контаминации.

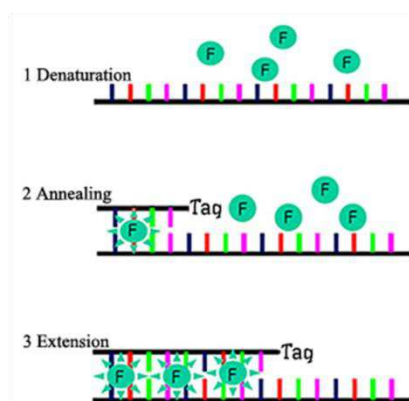


Рисунок 6 — Принцип модификации End-point

Олигонуклеотидные цепи ДНК помечаются специфическими молекулами флуорофора и «темнового» гасителя. В результате синтезируются так называемые «гибридные» зонды [14].

Меченные олигонуклеотиды вносятся в реакционную смесь.

Флуоресценция не визуализируется до тех пор, пока флуорофор и гаситель находятся неподалеку.

Во время проведения полимеразной цепной реакции зонды образуют комплексы с таргетной ДНК. Во время элонгации Таq-полимеразы расщепляет олигонуклеотидный зонд благодаря 5'-экзонуклеазной активности. Флуорофор и его гаситель отдаляются друг от друга и происходит свечение.

Меченные флуорофором олигонуклеотидные зонды, которые разрушаются в процессе ПЦР, обеспечивают соответствующий уровень флуоресценции. Количество наработанных ампликонов строго пропорционально количеству продуктов реакции.

Модификация End-point не является количественным методом [15].

1.6.4 Real-Time полимеразная цепная реакция

Флуоресцентные красители, которые обладают способностью связываться с двойными цепями ДНК, нашли свое применение в методе Real-time ПЦР. Так же используют дезокси-нуклеотиды, подвергшиеся модификациям. Они способны испускать флуоресцентное свечение после гибридизации с комплементарными нуклеотидными последовательностями ДНК.

ПЦР Real-time нередко сочетают с обратнo-транскриптазной ПЦР. Это помогает производить детекцию небольшого объема мРНК.

При применении ПЦР в режиме реального времени существует возможность исключить стадию гель-электрофореза. Это существенно

уменьшает опасность контаминантного заражения проб и минимизирует ложные результаты [17].

1.6.5 Multiplex полимеразная цепная реакция

Данный метод позволяет производить одномоментную амплификацию сразу нескольких нуклеотидных фрагментов ДНК в одной пробирке. Мультипраймерная ПЦР позволяет идентифицировать несколько видов патогенов, генетических мутаций и т.д. в одной пробирке [18].

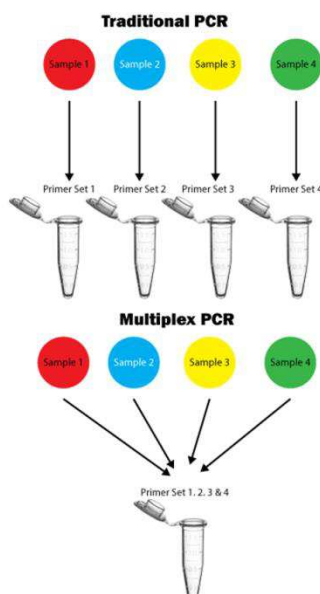


Рисунок 7 — Сравнение традиционной и Multiplex PCR

1.6.6 Инвертированный метод ПЦР

Если исследователю известен короткий фрагмент внутри изучаемой последовательности, используется инвертированный метод ПЦР.

Он позволяет определить соседние нуклеотиды после вставки ДНК в геном. Чтобы выяснить это, требуется произвести несколько рестрикционных разрезов с помощью эндонуклеаз с последующей сшивкой полученных фрагментов [19].

1.6.7 Long-range полимеразная цепная реакция

Применяется в случаях, если необходимо получить ампликоны довольно протяженных фрагментов ДНК. От десяти тысяч пар оснований и более. Для проведения Long-range ПЦР применяют смесь двух ферментов. Таq-полимеразу с большой продуктивностью: она может за раз синтезировать протяженный фрагмент ДНК. Так же в реакционную смесь добавляют ДНК-полимеразу, работающую в направлении 3'-5'. Таким ферментом является Pfu-полимераза. Она способна исправлять ошибки, произведенные Таq-полимеразой [22].

1.7 Электорофоретическое разделение фрагментов ДНК в агарозном геле

При использовании данного метода в целях электрофоретического разделения фрагментов ДНК, используются агарозные пластины. Концентрация геля составляет полтора-два с половиной процента агарозы. Нередко в буфер добавляют специфические красители для визуализации продуктов.

При заливке расплавленного геля, в камеру устанавливают специальные гребёнки, с помощью которых образуются лунки. После застывания агарозы, гребенки удаляют. В получившиеся лунки вносят ампликоны [24].

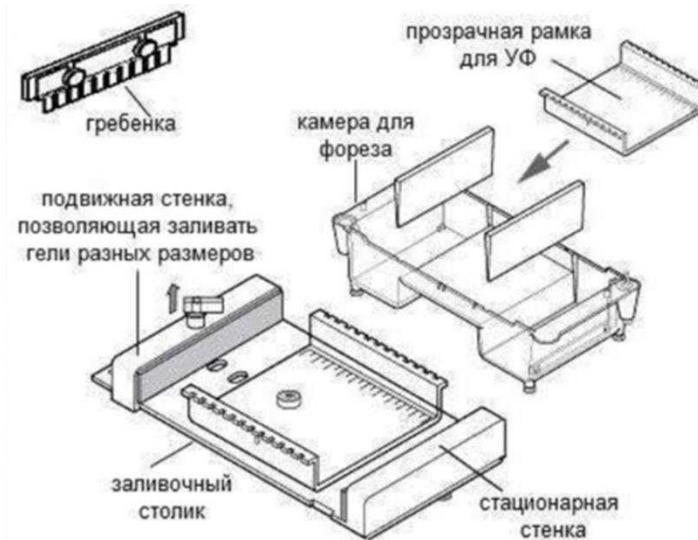


Рисунок 8 — Комплектующие для горизонтального электрофореза

Застывший гель с пробами опускают в горизонтальную форезную камеру. За счет работы источника напряжения, молекулы ДНК, обладающие отрицательным зарядом, бегут в направлении от отрицательного полюса к положительному. За счет сетчатой структуры геля мелкие фрагменты ДНК бегут быстрее, чем крупные.

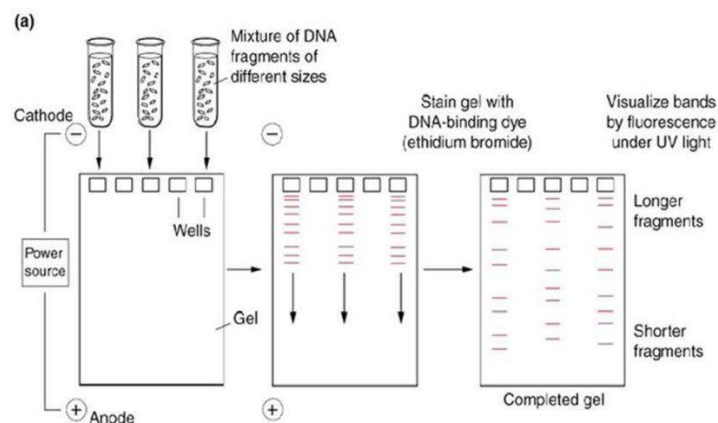


Рисунок 9 – Электрофорез

Гель-электрофорез длится от десяти минут до трех часов. После этого агарозную пластину надлежит отправить в трансиллюминатор, который излучает УФ-лучи (254 – 310 нм). ДНК способна поглощать лучи в районе 260 нм. Под воздействием УФ-излучения, флуоресцентный краситель

испускает свет, регистрируемый в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм) [24].

1.8 Метод вертикального гель-электрофореза

В качестве основы для геля выступает полиакриламид, помещаемый в вертикальную камеру.

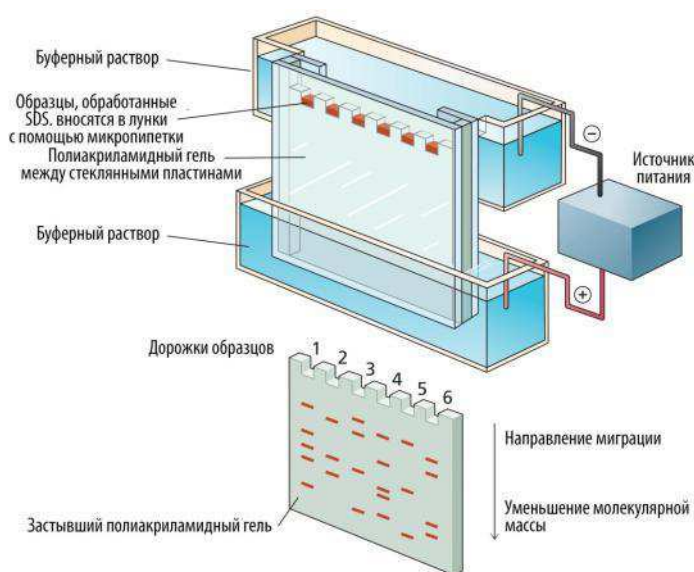


Рисунок 10 – Методика проведения вертикального гель-электрофореза

Электрофорез в полиакриламидном геле дает ряд преимуществ. Это высокоточный метод, который обладает максимальной разрешающей способностью. Производится полное разделение молекул ДНК, вплоть до одного нуклеотида.

В то же время, процесс сопряжен с некоторыми сложностями. В отличие от агарозы, полиакриламид это высокотоксичное соединение, оказывающее негативное влияние на живые организмы [26].

Агарозный и полиакриламидный гель-электрофоретические методы обладают рядом недостатков:

- Детекция занимает слишком много времени.
- Сделать процесс автоматическим нельзя.

- Трактовать результаты электрофореза довольно сложно. Свою роль играет субъективность восприятия.
- Существует огромный риск контаминации проб [27].

1.9 Restriction fragment length polymorphism

При данном методе исследования, амплифицированные фрагменты молекулы ДНК нарезаются рестрикционными эндонуклеазами. В последствии получившиеся рестрикты анализируются электрофорезом в агарозном или полиакриламидном геле [33].

ПДРФ анализ производится в несколько этапов:

- выделяется геномная ДНК;
- с помощью эндонуклеаз производится рестрикция нуклеотидной последовательности;
- затем производится разделение полученных фрагментов на геле-электрофорезе;
- на заключительном этапе фрагменты ДНК, в состав которых входит полиморфный сайт рестрикции, идентифицируются.

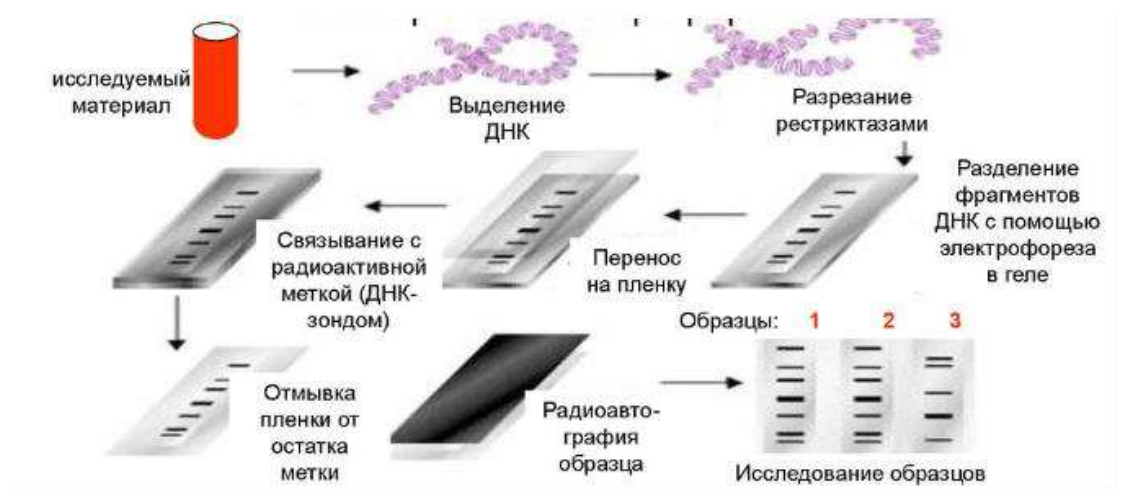


Рисунок 11 — Restriction fragment length polymorphism

Метод ПДРФ нашел широкое применение в популяционно-генетических исследованиях. Это возможно благодаря тому, что в геномах изучаемых организмов присутствуют рестрикционные фрагменты ДНК определенной длины.

Такие фрагменты — идеальный генетический маркер. Так же они выступают в качестве фенотипического признака, который обуславливается генотипом организма [34].

1.10 Секвенирование нового поколения

С помощью NGS ученые получили возможность за один временной промежуток исследовать множество участков генома. Это бесспорное преимущество, недоступное ранним методикам секвенирования генома [40].

Базой для методики NGS стало появление параллельных вычислительных систем для «чтения» ДНК. Секвенатор может получить данные относительно нескольких участков генома за один этап работы. Это удешевило и многократно ускорило геномные исследования.

Скорости прочтения геномов стали столь высоки, что производительность многих секвенаторов достигает сотен миллионов п. о. Благодаря этому геном *Homo sapiens* может быть прочтен за пару суток [41].

1.11 Основные постулаты NGS

Все технологии NGS имеют в своей основе секвенирование ДНК-чипов. При этом применяются энзиматические циклы, которые позволяют собирать наработанные данные воедино [42].

Секвенирование включает в себя следующие этапы:

1. Сначала синтезируются библиотеки случайных нуклеотидных цепей ДНК. Впоследствии их объединяют с помощью специфических адаптеров.

2. Используя полимеразную цепную реакцию, нарабатывают библиотеку ампликонов.

3. Расшифровывают первичную последовательность всех полученных участков генома [43].

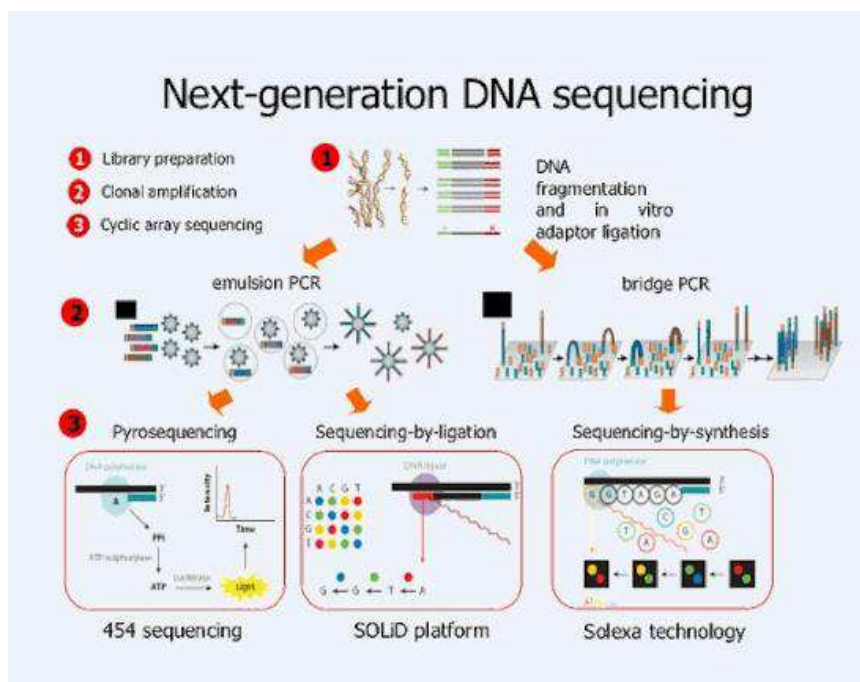


Рисунок 12 — Схема проведения NGS

1.12 Применение секвенирования нового поколения

— Геномные исследования. Благодаря технологиям NGS, ученые получили доступ к геномам всех живых существ от бактерий до такого сложно устроенного организма, как *Homo sapiens*. Благодаря новейшим разработкам удалось расширить длину геномных прочтений. Это позволило увеличить скорость сборки геномов ранее не изученных организмов.

— Кроме того, появилось такое понятие как направленное пересеквенирование. Расшифровка отдельных частей в геномах нужна для выявления мутаций в нуклеотидных последовательностях, которые участвуют в канцерогенезе и развитии неопухолевых заболеваний.

— Технологии NGS нашли свое применение в работах, направленных на изучение бактериального разнообразия во всевозможных пробах (примером могут служить анализ бактериальных сообществ в воде и земле, определение новых патогенных агентов при трансплантологии, в описании микрофлоры и т. д.)

— Расшифровка транскриптома. Благодаря NGS было создано РНК-секвенирование (RNA-seq). Оно применяется для учёта транскриптов в биологических пробах. Методика более успешна, чем ДНК-микрочипы, которыми исследователи пользовались прежде. Чипы зависят от перекрытия геномных последовательностей. RNA-seq делает возможным описание транскрипции генов, при этом не требуя знания определенного места в геноме, с которого запускается весь процесс транскрипции [44].

1.13 Негенетические методы идентификации микроорганизмов

Негенетические методы идентификации различных микроорганизмов разрабатывались и совершенствовались микробиологами и бактериологами на протяжении многих лет, и сегодня эти методы активно используются в науке, медицине, фармацевтике, промышленном производстве (в том числе продуктов питания) [45].

Разработанные методы идентификации микроорганизмов делят на рутинные и современные. Предпочтение отдается методам идентификации, которые выполняются за относительно короткий срок (часы) и отличаются высокой степенью объективности и точности [46].

1.14 Ручные методы идентификации бактерий

К ручным методам идентификации микроорганизмов относят: систему индикаторных бумажек, наборы мультимикротестов, метод хроматографии.

Ручные тесты, применяемые для индикации и идентификации микроорганизмов, важны для медицинской микробиологии и широко используются в санитарной микробиологии. Их постановка требует соблюдения стандартных условий проведения [46].

1.14.1 Виды ручных тест-систем

В последние десятилетия разработаны различные тест-системы: АРІ-20Е, Enterotube, ПБДЭ и многие другие [49].

Тест Enterotube состоит из 12 камерной пластины. В камерах находятся специфические среды, которые посредством окрашивания позволяют производить видовую диагностику бактерий.

Ячейки надлежит засеять специальной петлей с идентифицируемым материалом.

После этого пробы оставляют в термостате на двадцать четыре часа при температуре, равной тридцати семи градусам Цельсия.

При считывании результатов эксперимента ориентируются на цвет среды (при положительном результате ему надлежит измениться). Измеряют плотность и консистенцию агара на питательной среде. Так же могут использоваться специфические реактивы [50].

1.14.2 Система индикаторных бумажек

Такая система представляет собой диски, пропитанные различными питательными средами. Эти специальные диски можно вносить в пробирки с бактериями или предварительно вкладывать в лунки планшетов, в которые вносят исследуемые культуры микроорганизмов [51].

В частности, используют наборы дисков фирм Minitек (*Enterobacteriaceae*) и Minitек (*Neisseria*) для идентификации энтеробактерий

и нейссерий. Способ позволяет получить результаты через 4 ч инкубации при 37°C.

1.14.3 Антигенная структура как основа для иммуномагнитной дифференцировки

Данная методика основывается на применении парамагнитных молекул. Их диаметр составляет 2–3 мкм. Они заселяются АТ в течение суток, при этом окружающая температура должна быть отрицательной. После этого АТ, которые не сумели связаться с поверхностью частиц, отмываются [52].

Частицы, подвергнутые подобным манипуляциям, вносят в просуспендированные пробы. В пробах должны содержаться АГ, на которые среагируют АТ, находящиеся на поверхности частиц. Зачастую это токсины грамотрицательных микроорганизмов.

Пробу инкубируют при нормальной температуре. За несколько часов антигены связываются с антителами на поверхности частиц. Комплексы АТ и АГ собирают при помощи магнита. Лишние антигены отмывают, после чего подсчитывают количество образовавшихся комплексов.

Впоследствии АГ могут использоваться так же и в других исследованиях [53].

1.15 Хроматографические методы

С целью индикации и идентификации микроорганизмов нередко используют хроматографические методы. В объектах исследования определяют химический состав клеточной стенки и некоторые метаболиты микроорганизмов, причем как промежуточные, так и уникальные. Чаще всего у бактерий определяют короткоцепочечные жирные и тейхоевые кислоты, миколеву кислоту, используя метод газожидкостной хроматографии [54].

Нередко пользуются тонкослойной хроматографией. Содержание исследуемых веществ у различных родов бактерий постоянное, и это явление позволяет идентифицировать виды.

Липидные различия могут применяться для определения видовой принадлежности бактерий.

Данная методика не идеальна: качественное и количественное соотношение ЖК в клетках бактерий в некоторых случаях определяется временем культивирования и условиями, в которых была выращенная отдельно взятая культура.

Пигменты и хиноны, содержащиеся в микроорганизмах, имеют влияние на их видовую систематику.

Клеточные белки, которые являются ничем иным, как производными генов, могут давать важнейшую информацию о родственных группах бактерий.

Трансмембранные, клеточные и рибосомальные белки, а так же некоторые ферменты дали начало новому направлению — белковой систематике.

Рибосомальные белки чрезвычайно консервативны. Информацию, получаемую из них, применяют для выяснения видовой принадлежности микроорганизмов до семейства (порядка).

Трансмембранные белки позволяют определить систематику на уровне рода и вида [55].

1.16 Метод микрокалориметрии

В основе метода лежит энтальпия. Ее измеряют, дабы определить метаболическую активность бактерий.

В качестве оборудования используют дискретные и проточные микрокалориметры [56].

Катаболизм живой клетки приводит к изменению температуры. Когда клетка жива и пребывает в стадии физиологической активности, она выделяет тепло.

Результаты микрокалориметрии зависят от вида микроорганизма, размера инокулята, субстратов и других параметров. Ученые при помощи этого метода успешно идентифицировали промышленные штаммы дрожжей. Для этой цели успешно применяется проточная микрокалориметрия.

В процессе измерений микрокалориметр находится в проточном калориметрическом сосуде.

Для построения термограммы используют бактерии *Enterococcus*, *Leuconostoc* и *Lactobacillus*. Культуры растут при температуре, равной тридцати семи градусам Цельсия. Исключением является бактерия *S. Cremoris*. Для нее требуется 30°C. Эксперимент занимает около суток [56].

1.17 Серологический метод

Сыворотка крови и другие телесные жидкости подвергаются серологическим исследованиям в целях обнаружения АТ и АГ [44].

Серологические способы идентификации опираются на методику идентификации непосредственно АТ к известному или прогнозируемому болезнетворному штамму.

Положительный ответ может означать присутствие в исследуемом биоматериале АТ к АГ бактерии. Если проба отрицательна, это может свидетельствовать о том, что возбудитель не обнаружен в пробе.

Для установки правильного диагноза, требуется провести двойное исследование. Первое производится в первые дни заболевания, а последующее — через неделю. Такой подход позволяет отследить нарастание выработки АТ в организме.

Определение родственных бактерий сопряжена со сложностями [45].

1.18 MALDI-TOF методика

MALDI-TOF методика является высокоточным способом определения видовой принадлежности бактерий [47].

MALDI-TOF основывается на том, что в процессе исследования обнаруживается масс-спектр белков рРНК бактерии. Такие белки обладают сильной устойчивостью к мутациям. Они высокоспецифичны.

Полученный спектр надлежит сравнивать с информацией, содержащейся в базе данных. Score — единица родства. На основании нее можно сделать заключение о видовой принадлежности бактерии.

Для исследования MALDI-TOF применяют бактериальные культуры, растущие на специальной микробиологической среде. В исключительных случаях допускается определение видовой принадлежности в биологических материалах или в жидких пробах [48].



Рисунок 13 — Сравнение MALD-TOF методики и анализа видовой специфичности бактерий путем использования прибора VITEK 2 Compact

Определение видовой принадлежности ко-возбудителей сопряжено с рядом сложностей. Это является недостатком MALD-TOF методики. Белки α -гемолитических стрептококков отличаются высоким сходством — поэтому, масс-спектрометрия не является надежным методом их определения.

Данный метод, несмотря на все его недостатки, является довольно ценным в диагностическом плане. К его преимуществам можно, вне всякого сомнения, отнести высокую скорость анализа. Это чрезвычайно важно при лечении заболеваний, имеющих бактериальную природу.

Позволяет обойтись без времязатратного этапа культивирования.

Обладает высокой надежностью. Информация, получаемая с помощью MALD-TOF методики коррелирует с данными, которые предоставляют классические методы определения видовой принадлежности бактерий [48].

MALDI-TOF масс-спектрометрия облегчает лечение антибиотиками, так как благодаря ей становится возможным быстрое реагирование на возбудителя заболевания.

Может применяться в лабораторных условиях. Себестоимость бактериологических исследований не возрастает.

Рекомендован для применения в клинических центрах как дешевый и быстрый метод идентификации микроорганизмов [49].

1.19 Определение видовой принадлежности микроорганизмов при помощи биохимических методов

Определение видовой принадлежности микроорганизмов осуществляется с помощью определения бактериальных энзимов. Энзимы способны преобразовывать специфические субстраты.

Идентификация бактерий подобным образом занимает около суток. Идентификация непосредственно энзимов требует от четырех до шести часов.

Исследование видовой принадлежности бактерий с помощью биохимических методов осуществляется при использовании так называемых «чистых культур». Используются дифференциальные среды для диагностики. Они имеют в своем составе субстрат, который используется ферментами бактерии. Так же присутствует рН-индикатор [50].

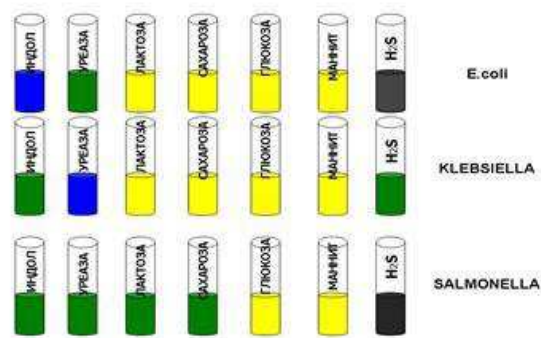


Рисунок 14 — Биохимическое исследование энтеробактерий. В качестве индикатора выступает — БФС. Нейтральный pH идентифицируется зеленым, при кислых раствор желтеет, в присутствии щелочей — синеет. При сероводороде среда окрашивается в черный цвет.

1.20 Автоматические системы идентификации бактерий

Системы распознавания с использованием специальных приборов позволяют за сравнительно короткое время определить вид микроорганизма, а также его чувствительность/устойчивость к антимикробным препаратам.

Наибольшей популярностью пользуются автоматические системы идентификации микроорганизмов типа Microscan и Vitek [51].

1.20.1 Система MICROSCAN

Данная система идентификации бактерий основана на явлениях турбидиметрии, колориметрии и флуоресценции. Система включает ряд пластиковых планшетов, в которые помещены биохимически активные субстраты.

В основу распознавания грамотрицательных бактерий положено свойство комплекса антиген + антитело испускать «холодное» свечение благодаря искусственной адсорбции на антителах, светящихся в УФ-лучах, специальных белков – флуорохромов. Время анализа – 2 часа.

Гемофилы, анаэробы и дрожжи идентифицируются методом, основанным на иммунохроматографии. Концентрацию антибиотиков определяют с учетом оптической плотности исследуемого субстрата. Система оборудована компьютером и программным обеспечением [52].

1.20.2 Система VITEK

Используются планшеты. Суспензию бактерий определенной концентрации вносят в лунки. Распознавание микроорганизмов основано на турбидометрии раствора в лунке. Время анализа — от 4–8 до 18 часов. Система оборудована компьютером и программным обеспечением [52].

1.20.3 Анализ микроорганизмов *in silico*

In silico – термин, обозначающий компьютерную симуляцию эксперимента, чаще биологического.

С помощью компьютерного моделирования анализируют нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности, производят выравнивание последовательностей, поиск гомологичных цепей ДНК, РНК и белков, построение филогенетических карт, используя специальное программное обеспечение.

Осуществляют такие манипуляции как: теоретические амплификацию, рестриктирование, электрофорез. Геномы могут иметь длину до нескольких миллиардов пар нуклеотидов. Данный метод позволяет анализировать различные геномы за короткое время, осуществлять поиск нужных последовательностей ДНК, РНК, белков и работать с ними [52].

Применение биоинформационного подхода позволяет планировать и моделировать эксперименты для того что бы снизить вероятность ошибки в ходе практического эксперимента, а также снизить количество ресурсов [52].

1.21 Традиционные методы бактериологического анализа

Данный метод, как правило, включает в себя следующие этапы:

Этап первый: прежде всего, следует произвести посев на чашки Петри. Используются специальные дифференциальные среды, которые позволяют произвести диагностику посева.

Этап второй: лаборант снимает отдельно выросшие колонии и накапливает так называемые «чистые культуры». Их получают с первичной дифференциацией. Для достижения цели рекомендуется использовать комбинированные питательные среды.

Этап третий: на третьем этапе производится идентификация исследованной культуры. Используются биохимические признаки, данные о патогенности, сведения об антигенной структуре и устойчивости бактерий.

Анализ данного типа, как правило, занимает до четырех-пяти суток.

Эпидемиологи находят такие сроки неудовлетворительными. При особо опасных заболеваниях (примером может служить лихорадка Эбола, свирепствующая на Африканском континенте), необходимы более быстрые методы идентификации неизвестных возбудителей [53].

1.22 Недостатки традиционных методов бактериологического анализа

- Требуется много времени на идентификацию микроорганизмов;
- Затрачиваются значительные материальные ресурсы;
- Некультивируемые бактерии не определяются.

В связи с вышеизложенными причинами существует необходимость использовать более современные и быстрые способы диагностики. В качестве эффективного метода идентификации в лабораторной диагностике для определения микроорганизмов все чаще применяются методики, основанные на применении полимеразной цепной реакции [54].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Методика теоретического применения ARDRA

1. Для произведения теоретического рестриктирования нуклеотидных последовательностей бактерий, необходимо:
2. Найти в базе данных GenBank последовательности нужных штаммов, которые будут использоваться для проведения практической части исследования;
3. Получить ампликоны 8F-1492R для этих штаммов;
4. Виртуально прорестриктировать полученные ампликоны рестриктазами, которые планируется использовать в работе. Для этого необходимо использовать программу pDRAW32;
5. Далее следует произвести анализ полученных результатов;
6. В конце работы необходимо сравнить данные теоретической и практической работы.

2.2 Способ получения идентифицируемых бактерий

Образцы бактерий, идентифицируемые в работе, были любезно предоставлены моими коллегами с Базовой Кафедры Биотехнологии Сибирского Федерального Университета.

2.3 Методика выделения ДНК с помощью набора реагентов SILICA uni

Реактивы для выделения ДНК:

- 1) Лизирующий раствор
- 2) Отмывочный раствор №1
- 3) Отмывочный раствор №2
- 4) Элюирующий раствор

5) Сорбент (водная суспензия)

Способ получения дезоксирибонуклеиновых кислот для полимеразной цепной реакции в процессе пробоподготовки можно совершить с помощью набора реагентов SILICA uni.

В основу данного метода положена способность нуклеиновых кислот отсорбироваться на частицах кремния (так называемое «glass milk», SiO₂). Данное свойство делает возможным получение проб с минимизированными потерями.

При этом препараты ДНК выделяются в качестве, которое является оптимальным для проведения полимеразной цепной реакции.

Пробоподготовка занимает примерно 1 час.

ДНК, полученные при использовании SILICA uni, пригодны для ПЦР. Процедура определения концентрации ДНК не обязательна [55].

Ход работы:

1. В пробирку вносим 220 мкл лизирующего раствора.
2. Вносим исследуемую пробу в микропробирку с помощью микробиологической петли.
3. Помещаем пробы на вортекс. Впоследствии центрифугируем на протяжении 10 минут при режиме работы 13 400 оборотов.
4. С помощью автоматического дозатора отбираем надосадочную жидкость и переносим в чистую пробирку. Затем добавим 20 мкл суспензии сорбента. Перед использованием сорбента, полностью суспендируем его на вортексе.
5. Содержимое пробирки с пробой встряхиваем на вортексе и оставляем в штативе на 10 мин. для адсорбции ДНК, в течение которых каждые 3 минуты перемешиваем.
6. Пробы помещаем в центрифугу. Процедура занимает 20 секунд. Режим работы — 13 400 оборотов.
7. Надосадочную фракцию убираем.

8. Вносим 500 мкл отмывочной жидкости №1, осадок ресуспендируем, встряхиваем на вортексе.

9. Центрифугируем пробы 30 секунд при 2 тысячах оборотов.

10. Надосадочную жидкость удаляем.

11. К осадку прибавляем 500 мкл рабочего отмывочного раствора №2, осадок ресуспендируем, встряхиваем на вортексе.

12. Центрифугируем пробы 30 секунд при 2 тыс. оборотов. Надосадочную жидкость полностью удаляем.

13. Повторяем операции, изложенные в пп.11 и 12.

14. Открытую пробирку помещаем в термостат и сушим осадок 5 мин. при 65 градусах.

15. К высушенному осадку добавим 75 мкл элюирующего раствора, пробирку закрываем и термостатируем 1-2 мин. при 65 градусов.

16. Пробирку следует поместить на вортекс. Это позволяет произвести ресуспендирование осадка. Далее помещаем пробу в термостат и оставляем в прежних условиях на следующие пять минут. Снова помещаем на вортекс.

17. Пробирку отправляем в центрифугу, процедура занимает минуту, при режиме в 10 000 оборотов. Жидкость из верхней фазы, которая представляет собой раствор ДНК, необходимо перенести в чистый эппендорф. Осадок выбрасывается. В дальнейшем препарат ДНК будем использовать для проведения ПЦР.

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

Мы выделяли ДНК из образцов бактерий для дальнейшего проведения ПЦР с целью получения ампликонов гена 16S рРНК.

2.4 Методика проведения электрофореза

Оборудование для проведения и документирования электрофореза:

1. Генератор постоянного напряжения.
2. Электрофоретическая камера.
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-ацетатные, трис-боратные, трис-фосфатные);
4. ДНК-маркеры;
5. 6-тикратный буфер для нанесения (ксиленцианол FF, метиленовый синий, сахароза и вода).

Ход реакции:

1. Взвешиваем агарозу и добавляем ее к соответствующему количеству 0.5x TAE буфера.
2. Помещаем в работающую микроволновую печь на 45-50 с, до получения однородной суспензии.
3. Устанавливаем гребенку в форму для агарозы (форму выравниваем по уровню, для равномерного нанесения раствора)
4. Переливаем раствор в форму для агарозы.
5. Оставляем гель на 25 минут для застывания.
6. Удаляем гребенку и помещаем гель в электрофоретическую кювету.
7. Покрываем гель слоем электрофоретического буфера (гель должен быть покрыт буфером, толщина которого 1см).
8. Производим внесение проб ДНК в буфер, соблюдая пропорции 5:1. Вносим смесь в лунки геля под электрофоретический буфер с помощью сэмплера. Наносим маркер (в 1 и последнюю лунки).

9. Подсоединяем электроды, устанавливаем напряжение и время, запускаем электрофорез.

10. Сверху кладем хладагент.

11. После окончания электрофореза достаем гель и погружаем его в бромистый этидий для окрашивания. После устанавливаем на вортекс, на 25 минут.

12. Промываем гель дистиллированной водой.

13. Окрашенный гель помещаем в трансиллюминатор.

14. Рассматриваем гель в ультрафиолетовом свете и документируем полученные изображения.

2.5 Методика очистки ампликонов

Очистку ампликонов производим с помощью набора Diatom DNA Clean-UP (производство фирмы IsoGene).

Очистка ампликонов с использованием набора реагентов Diatom DNA Clean-UP основана на использовании солюбилизующего реагента (в соотношении пробы к солюбилизующему реагенту), в присутствии которого ДНК сорбируется на поверхности 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 (этанолом).

Таким образом ДНК полностью очищается от сопутствующих примесей: избытка праймеров, димеров-праймеров, dNTP, с дальнейшей элюцией с сорбента бидистиллированной водой. Очищенная таким методом ДНК может быть использована для дальнейшей рестрикции и секвенирования.

Данный набор обеспечивает высокую чистоту очищенной ДНК – OD 260/280 – 1.8-2.0. Особенно эффективен при очистке ДНК размером от 200 до 20 000 п. о.

2.6 Проведение ПЦР

Реакцию ПЦР проводим в приборе Thermal Cycler C1000.

На одну пробу объемом 50 мкл требуется:

- 27 мкл дистиллированной воды;
- 5 мкл 10x буфера;
- 5 мкл + 5 мкл праймеров с концентрациями по 1 μ M (8L – 1492R);
- 3 мкл MgCl₂ с концентрацией 2.5mM.

Ход работы:

1. Все вещества смешиваем в 1 пробирке объемом 1,5 мл из расчета на 15 проб.
2. В каждую пробирку добавляем по 47 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемой ДНК.
3. Перед горячим стартом в каждую из пробирок добавляем по 1 мкл ДНК Таг-полимеразы.
4. Для визуализации результатов амплификации используем электрофорез.
5. После окончания электрофореза гель помещаем в транслюминатор гель-документирующей системы.

Программа для проведения ПЦР:

1. 94⁰C – 3:00 мин;
2. 80⁰C – 0:40 с;
3. 95⁰C – 0:10 с;
4. 62⁰C – 0:20 с;
5. 72⁰C – 1:40 мин;
6. Go to 3 35 times;

7. 72⁰C for 10:00 мин;

8. 4⁰C – 18:00:00 ч;

9. END.

2.7 Проведение реакции рестрикции

Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 2 часов в приборе Thermomixer comfort (производство фирмы Eppendorf).

Реакция проходила при 37⁰C (для рестриктаз MspI, HaeIII) и 55⁰C (FatI) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 ед. акт. рестриктазы.

Таблица 1 — Сайты рестрикции для Msp I, Hae III, FatI

Наименование рестриктазы	Сайт узнавания
Msp I	5'-C [^] CGG-3' 3'-GGC [^] C-5'
Hae III	5'-GG [^] CC-3' 3'-CC [^] GG-5'
FatI	5'- [^] CATG-3' 3'-GTAC [^] -5'

Для постановки реакции рестрикции для 1 пробы объемом 50 мкл требуется:

- 5 мкл 10x буфера;
- 10 мкл разб. BSA;
- 25 мкл H₂O;
- 10 мкл ДНК;
- 5 мкл фермента (активность фермента 10 000 е.а/мл).

Ход работы:

1. Все вещества смешиваем на холоду в 1 пробирке объемом 2 мл, из расчета на 15 проб.

2. В каждую пробирку добавляем по 35 мкл данной смеси и по 15 мкл исследуемой ДНК.

3. Для визуализации результатов рестрикции используем электрофорез.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из текста магистерской диссертации изъяты, с 43 по 53 страницу, результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Построила теоретические электрофореграммы для ряда бактерий с использованием рестриктаз *NotI*, *MspI*, *FatI* методом ARDRA (рестрикционный анализ ампликонов гена 16S рРНК).
2. Выделила ДНК из ряда образцов бактерий.
3. Получила ампликоны гена 16S рРНК образцов бактерий.
4. Провела гидролиз полученных ампликонов с использованием рестриктаз *NotI*, *MspI*, *FatI* и электрофорез продуктов гидролиза.
5. Проанализировала полученные результаты электрофореза и сравнила практические и теоретические результаты.

Исследуемые образцы оказались представителями видов *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Arthrobacter aurescens*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Bacillus atrophaeus*, *Arthrobacter globiformis*.

Метод ARDRA (рестрикционный анализ ампликонов гена 16S рРНК) в дополнение к классическим методам может служить достаточно удобным способом идентификации микроорганизмов.

На данный метод не так сильно влияет загрязнение ДНК, как на секвенирование. В ходе работы мы доказали возможность применения метода для доподлинного, скорого и бюджетного определения конкретных микроорганизмов в исследуемой среде. Используя метод ARDRA, результат можно получить в течение дня.

Сопутствующие исследования показали, что исследования по методу ARDRA дают более подлинны результаты по сравнению с масс-спектрометрическим анализом видовой принадлежности бактерий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДНК (DNA) — дезоксирибонуклеиновая кислота
- кДНК — комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
- ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) — рестрикционный анализ амплификации гена 16S рРНК
- РНК (RNA) — рибонуклеиновая кислота
- рРНК (rRNA) — рибосомная рибонуклеиновая кислота
- тРНК (tRNA) — транспортная рибонуклеиновая кислота
- мРНК (mRNA) — матричная рибонуклеиновая кислота
- ПЦР — Полимеразная цепная реакция
- T_m - температура плавления
- dNTP — нуклеозидтрифосфат
- ПАВ — поверхностно-активные вещества
- СНП (NGS) — секвенирование нового поколения
- RNA-seq — РНК-секвенирование
- УФ — ультрафиолетовое излучение
- п.о. — пары оснований
- ПДРФ — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
- мкл — микролитр
- мкг — микрограмм
- мл — миллилитр
- SiO₂ — оксид кремния
- Mg²⁺ — ионы магния
- in silico* — теоретическое (компьютерное) моделирование эксперимента
- in vitro* — технология выполнения экспериментов вне живого организма
- E. coli* — *Escherichia coli*
- S. Cremoris* — *Streptococcus Cremoris*
- L. monocytogenes* — *Listeria monocytogenes*

SUMMARY

In this work we show the applicability of the method of amplified ribosomal DNA restriction analysis for the identification of microorganisms.

During the process of our work we obtained a high quality DNA from 17-samples of bacteria. Further we performed the analysis of nucleotide sequence of 16S rRNA genes of these bacteria using PCR and restriction enzyme analysis.

We obtained restriction fragments of same amplicons 16S rRNA gene of these bacteria and analyzed their electrophorograms. The restriction enzymes used were Hae III, Msp I, Fat I.

After completion of the ARDRA analysis we discovered that the studied samples were representatives of the following species:

- *Bacillus mycooides*,
- *Bacillus pumilus*,
- *Bacillus methylotrophicus*,
- *Bacillus toyonensis*,
- *Bacillus amyloliquefaciens*,
- *Arthrobacter aurescens*,
- *Microbacterium phyllosphaerae*,
- *Bacillus atropheus*,
- *Arthrobacter globiformis*.

Method of amplified ribosomal DNA restriction analysis combined with using the genetic database for sequenced DNA (GenBank) can serve as a relatively simple method for identifying microorganisms.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prieto-Barajas, C. M., Alfaro-Cuevas, R., Valencia-Cantero, E. Effect of seasonality and physicochemical parameters on bacterial communities in two hot spring microbial mats from Araró, Mexico / C. M. Prieto-Barajas, R. Alfaro-Cuevas, E. Valencia-Cantero // *Revista Mexicana de Biodiversidad*. – 2017. – № 88. – С. 616–624.
2. Ellington, M.J., Ekelund, O., Aarestrup, F.M. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee / M.J. Ellington, O. Ekelund, F.M. Aarestrup // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2017. – № 23. – С. 2–22.
3. Gislin, D., Sudarsanam, D. Antibacterial activity of soil bacteria isolated from Kochi, India and their molecular identification / D. Gislin, D. Sudarsanam // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. – 2018. – № 4. – С. 24–26.
4. Escobar-Zepeda, A., Godoy-Lozano, E., Raggi, L. Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics / A. Escobar-Zepeda, E. Godoy-Lozano, L. Raggi // *Scientific Reports*. – 2018. – № 8. – С. 2–13.
5. Sujeesh, S., Malhotra, M. Utility of 16S rRNA PCR in the Synovial Fluid for the Diagnosis of Prosthetic Joint Infection / S. Sujeesh, M. Malhotra // *Ann Lab Med*. – 2018. – № 38. – С. 610–612.
6. Andrey, A., Pimkina, E. The Study of Viral RNA Diversity in Bird Samples Using De Novo Designed Multiplex Genus-Specific Primer Panels / A. Andrey, E. Pimkina // *Advances in Virology*. – 2018. – № 10. – С. 10–20.
7. Watanabe, N., Kryukov, K., Nakagawa, S. Detection of pathogenic bacteria in the blood from sepsis patients using 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis / N. Watanabe, K. Kryukov, S. Nakagawa // *Plos One*. – 2018. – № 5. – С. 1–11.
8. Khosravi, H., Dolatabad, H. K. Identification and molecular characterization of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter salinestris* using

ARDRA, REP, ERIC, and BOX / H. Khosravi, H. K. Dolatabad // *Mol Biol.* – 2020. – № 1. – C. 307–316.

9. Deepthi, K. G., Jayasudha, R. Polybacterial community analysis in human conjunctiva through 16S rRNA gene libraries / K. G. Deepthi, R. Jayasudha // *Exp Eye Res.* – 2018. – № 9. – C. 174–180.

10. Vázquez-Marrufo, G.1., Rosales-Castillo, J. A. Multi-Typing of Enterobacteria Harboring LT and ST Enterotoxin Genes Isolated from Mexican Children / G.1.Vázquez-Marrufo, J. A.Rosales-Castillo // *Jpn J Infect Dis.* – 2017. – № 7. – C. 50–60.

11. Sourri, P., Doulgeraki, A. A single enzyme PCR-RFLP assay targeting V1-V3 region of 16S rRNA gene for direct identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from other *Alicyclobacillus* species / P. Sourri, A. Doulgeraki // *J Appl Genet.* – 2019. – № 5. – C. 225–229.

12. Phadke, S., Salvador, A. F. Harnessing the Power of PCR Molecular Fingerprinting Methods and Next Generation Sequencing for Understanding Structure and Function in Microbial Communities / S. Phadke, A. F. Salvador // *Methods Mol Biol.* – 2017. – № 2. – C. 225-248.

13. Nishi, E., Watanabe, K. Terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial flora derived from single human hair shafts can discriminate individuals / E. Nishi, K. Watanabe // *Leg Med.* – 2017. – № 3. – C. 75–82.

14. Korona-Głowniak, I., Siwiec, R. Molecular diagnostics of periodontitis / I. Korona-Głowniak, R. Siwiec // *Postepy Hig Med Dosw.* – 2017. – № 6. – C. 47–56.

15. Siqueira, J.F., Sakamoto, M. Microbial Community Profiling Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) / J.F. Siqueira, M.Sakamoto // *Methods Mol Biol.* – 2017. – № 11. – C. 139–152.

16. Rohit, A., Maiti, B., Shenoy, S. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for rapid diagnosis of neonatal sepsis / A. Rohit, B. Maiti, S.Shenoy // *Indian J Med Res.* – 2016. – № 6. – C. 72 –78.

17. Alegría-Puig, C. R., Marco F. Evaluation of Vitek-MS™ and Microflex LT™ commercial systems for identification of *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* complex / C. R. Alegría-Puig, F. Marco // *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. – 2020.
18. Castro, J., Jefferson, K. K. Genetic Heterogeneity and Taxonomic Diversity among *Gardnerella* Species / J. Castro, K. K. Jefferson // *Trends in Microbiology*. – 2020. – № 28. – C. 202–211.
19. Kakelara, H., Barzegari, A. Isolation and molecular identification of *Lactobacillus* with probiotic potential from abomasums driven rennet / H. Kakelara, A. Barzegari // *Food Chemistry*. – 2019. – № 272. – C. 709–714.
20. Fernández-Cuenca, F., Tomas, M. Reporting identification of *Acinetobacter* spp genomic species: A nationwide proficiency study in Spain / F. Fernández-Cuenca, M. Tomás // *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. – 2019. – № 37. – C. 89–92.
21. Adhikary, S., Boot, R. Development of multi locus sequence typing (MLST) of *Rodentibacter pneumotropicus* / S. Adhikary, R. Boot // *Veterinary Microbiology*. – 2019. – № 231. – C. 11–17.
22. López, A. C., Alippi, A. M. Feasibility of using RFLP of PCR-amplified 16S rRNA gene(s) for rapid differentiation of isolates of aerobic spore-forming bacteria from honey / A. C. López, A. M. Alippi // *Journal of Microbiological Methods*. – 2019. – № 165.
23. Harvey, M., Bridge, W. J. Application of colony BOXA2R-PCR for the differentiation and identification of lactic acid COCCI / M. Harvey, W. J. Bridge // *Food Microbiology*. – 2019. – № 82. – №138. – C. 23–27.
24. Solanki, M., Kundu, B. S. Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat / M. Solanki, B. S. Kundu // *Annals of Agrarian Science*. – 2018. – № 16. – 458–463.
25. Sun, Y., Peng, J. Combination of amplified rDNA restriction analysis and high-throughput sequencing revealed the negative effect of colistin sulfate on the diversity of soil microorganisms / Y. Sun, J. Peng // *Microbiological Research*. – 2018. – № 206. – C. 9–16.

26. Deepthi, K. N. Polybacterial community analysis in human conjunctiva through 16S rRNA gene libraries / K. N. Deepthi // *Experimental Eye Research*. – 2018. – № 174. – С. 1–12.
27. Hameed, S., Xie, L. Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: A review / S. Hameed, L. Xie // *Trends in Food Science & Technology*. – 2018. – № 81. – С. 61–73.
28. Stefana, A., Van, J. Genetic diversity and structure of *Rhizobium leguminosarum* populations associated with clover plants are influenced by local environmental variables / A. Stefana, J. Van // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2018. – № 41. – С. 251–259.
29. Zhang, X., Ge, Q. Microbiological community of the Royal Palace in Angkor Thom and Beng Mealea of Cambodia by Illumina sequencing based on 16S rRNA gene / X. Zhang, Q. Ge // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2018. – № 134. – С. 127–135.
30. Peix, A., Ramírez-Bahena, M. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update / A. Peix, M. Ramírez-Bahena // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2018. – № 57. – С. 106–116.
31. Liu, C., Yang, Z. Deciphering the bacterial and fungal communities in clubroot-affected cabbage rhizosphere treated with *Bacillus Subtilis* XF-1 / C. Liu, Z. Yang // *Agriculture, Ecosystems & Environment*. – 2018. – № 256. – С. 12–22.
32. Безбородова, Н. А., Ким, Н. А. Сравнение лабораторных методов диагностики инфекций, вызываемых патогенными и условно-патогенными микроорганизмами / Н. А. Безбородова, Н. А. Ким // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2018. – № 2. – С. 46–47.
33. Rai, P., Sharma, A. Comparison of molecular and phenetic typing methods to assess diversity of selected members of the genus *Bacillus* / P. Rai, A. Sharma // *Microbiology*. – 2016. – № 2. – С. 236–246.
34. Rashid, Z., Ashraf, A. Benchmark taxonomic classification of chicken gut bacteria based on 16S rRNA gene profiling in correlation with various feeding strategies / Z. Rashid, A. Ashraf // *Journal of King Saud University – Science*. – 2020. – № 32. – С. 1034–1041.

35. Bador, J., Nicolas, B. 16S rRNA PCR on clinical specimens: Impact on diagnosis and therapeutic management / J. Bador, B. Nicolas // *Médecine et Maladies Infectieuses*. – 2020. – № 50. – C. 63–73.
36. Noguchi, K., Nishimura, R. Half of ‘*Micrococcus* spp.’ cases identified by conventional methods are revealed as other life-threatening bacteria with different drug susceptibility patterns by 16S ribosomal RNA gene sequencing / K. Noguchi, R. Nishimura // *Journal of Infection and Chemotherapy*. – 2020. – № 26. – C. 318–319.
37. Santos, A., Aerle, R. Computational methods for 16S metabarcoding studies using Nanopore sequencing data / A. Santos, R. Aerle // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2020. – № 18. – C. 296–305.
38. Greninger, A. L., Naccache, S. N. Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis / A. L. Greninger, S. N. Naccache // *Genome Med*. – 2017. – № 7. – C. 99.
39. Hosseini-Chegeni, A., Kayedi, M. H. Molecular detection of *Coxiella* (Gammaproteobacteria: Coxiellaceae) in *Argas persicus* and *Alveonanus canestrinii* (Acari: Argasidae) from Iran / A. Hosseini-Chegeni, M. H. Kayedi // *Microbial Pathogenesis*. – 2020. – № 139.
40. Gritli, T., Ellouze, W. Genotypic and symbiotic diversity of native rhizobia nodulating red pea (*Lathyrus cicera* L.) in Tunisia / T. Gritli, W. Ellouze // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2020. – № 43.
41. Liu, Y., Yu, S. Genotypic differences in CC224, CC363, CC449 and CC446 of *Moraxella catarrhalis* isolates based on whole genome SNP, MLST and PFGE typing / Y. Liu, S. Yu // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2020. – № 310.
42. Fadiji, A. E. Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review / A. E. Fadiji // *Journal of Microbiological Methods*. – 2020. – № 170.
43. Celin, S. M., Sahai, S. Environmental monitoring approaches used during bioremediation of soils contaminated with hazardous explosive chemicals / S. M. Celin, S. Sahai // *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. – 2020. – № 36.

44. Gaglio, R., Cirilincione, F. Microbial dynamics in durum wheat kernels during aging / R. Gaglio, F. Cirilincione // *International Journal of Food Microbiology*. – 2020. – № 13.
45. Beims, H., Bunk, B. Discovery of *Paenibacillus larvae* ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood / H. Beims, B. Bunk // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2020. – № 310.
46. Zhai, W., Qin, T. Abundance and diversity of microbial arsenic biotransformation genes in the sludge of full-scale anaerobic digesters from a municipal wastewater treatment plant / W. Zhai, T. Qin // *Environment International*. – 2020. – № 138.
47. Pahumunto, N., Piwat, S. Fermented milk containing a potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* SD11 with maltitol reduces *Streptococcus mutans*: A double-blind, randomized, controlled study / N. Pahumunto, S. Piwat // *Journal of Dental Sciences*. – 2020. – № 6.
48. Teanpaisan, R., Dahlen, G. Use of polymerase chain reaction techniques and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for differentiation of oral *Lactobacillus* species / R. Teanpaisan, G. Dahlen // *Oral Microbiol Immunol*. – 2016. – № 21. – C. 79–83.
49. Piwat, S., Teanpaisan, R. 16S rRNA PCR-denaturing gradient gel electrophoresis of oral *Lactobacillus casei* group and their phenotypic appearances / S. Piwat, R. Teanpaisan // *ISRN Microbiol*. – 2017. – № 13. – C. 1–6.
50. Nadkarni, M. A., Martin, F. E. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set / M.A. Nadkarni, F.E. Martin // *Microbiology*. – 2018. – № 148. – C. 257–266.
51. Oho, T., Yamashita, Y., Koga, T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction / T. Oho, Y. Yamashita, T. Koga // *Oral Microbiol Immunol*. – 2016. – № 15. – C. 258–262.

52. Zia, Q., Alawami, M. Current analytical methods for porcine identification in meat and meat products / Q. Zia, M. Alawami // – 2020. – № 324.

53. Girish, P. S., Barbuddhe, S. B. Rapid detection of pork using alkaline lysis- Loop Mediated Isothermal Amplification (AL-LAMP) technique / P. S. Girish, S. B. Barbuddhe // Food Control. – 2020. – № 110.

54. Ricciardi, A., Storti, L. V. Analysis of rpoB polymorphism and PCR-based approaches for the identification of *Leuconostoc mesenteroides* at the species and subspecies level / A. Ricciardi, L. V. Storti // International Journal of Food Microbiology. – 2020. – № 318.

55. Sultana, S., Hossain, M. A. TaqMan Probe Based Multiplex Quantitative PCR Assay for Determination of Bovine, Porcine and Fish DNA in Gelatin Admixture, Food Products and Dietary Supplements / S. Sultana, M. A. Hossain // Food Chemistry. – 2020. – № 7.

56. Hansen, S., Pessô, R. Dataset of the microbiome composition in skin lesions caused by lumpy skin disease virus via 16s rRNA massive parallel sequencing / S. Hansen, R. Pessô // Data in Brief. – 2019. – № 27.

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

« 13 » июля 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Определение видов бактерий современными методами

06.04.01 - Биология

06.04.01.05 - Реконструктивная Биоинженерия


Научный руководитель


подпись, дата

доцент, к.б.н
должность, ученая степень

О.А.Гусейнов
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

Н.С.Арстова
инициалы, фамилия

Рецензент


подпись, дата

доцент, к.б.н
должность, ученая степень

Л. С. Смирнова
инициалы, фамилия

Красноярск 2020