

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ Е. И. Шишацкая

« ____ » _____ 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Применение метода рестрикционного анализа гена рРНК для идентификации
возможных возбудителей заболеваний

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная Биоинженерия

Научный руководитель	_____	<u>доцент, к.б.н</u>	<u>О. А. Гусейнов</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>Т. В. Деринг</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>профессор, д.б.н</u>	<u>О. П. Дубовская</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме "Применение метода рестрикционного анализа гена рРНК для идентификации возможных возбудителей заболеваний" содержит 63 страницы текстового документа 27 иллюстраций, 4 таблицы, 70 использованных источников.

Ключевые слова: возбудители заболеваний, ген 16S рРНК, рестриктаза, ампликон, ПЦР.

Цель данной работы: Используя метод рестрикционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК осуществить идентификацию представленных образцов бактерий.

Для достижения заданной цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Провести анализ *in silico* ампликонов 500F-1350R и 8F-1492R гена 16S рРНК с использованием баз данных GenBank, и построить теоретические электрофореграммы.

2. Из биомассы образцов почвенных бактерий выделить ДНК и получить ампликоны гена 16S рРНК используя пары праймеров 500F-1350R и 8F - 1492R.

3. Для полученных ампликонов провести реакции рестрикции используя следующий набор рестриктаз: Sse9 I, Hae III, Rsa I, Msp I, Fat I, Tag I, Tru9 I, BstNI I.

4. Провести электрофорез продуктов рестрикции, проанализировать полученные электрофореграммы.

5. Сравнить теоретические и практические электрофореграммы и идентифицировать микроорганизмы.

В результате проведения работы предоставленные микроорганизмы были идентифицированы. Были определены наиболее подходящие рестриктазы для определения следующих родов бактерий: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Agrobacterim*, *Pantoea*, *Microbacterium*, *Exiguobacterium*, *Arthrobacter*.

Была создана база данных для идентификации. Метод рестрикционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК при правильном подборе эндонуклеаз рестрикции, в дополнении к традиционным методам, может служить удобным и дешевым способом для определения вида микроорганизмов.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1 Обзор литературы	7
1.1 Генетический аппарат бактерий	7
1.2 Ген 16S рРНК.....	8
1.3 Бактерии, возможные возбудители заболеваний	9
1.3.1 <i>Escherichia coli</i>	9
1.3.2 <i>Klebsiella pneumonia</i>	10
1.3.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.3.4 <i>Staphylococcus spp.</i>	11
1.3.5 <i>Enterobacter spp.</i>	13
1.3.6 <i>Enterococcus spp</i>	14
1.3.7 <i>Streptococcus spp</i>	15
1.3.8 <i>Bacteroides spp</i>	16
1.4 Метод Масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS)	17
1.5 Полимеразная цепная реакция	18
1.5.1 Этапы и компоненты ПЦР	19
1.5.2 Эффект плато	22
1.6 Секвенирование	23
1.6.1 Секвенирование по Сэнгеру.....	23
1.7 Метод рестриционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК.....	24
1.8 Рестрикция	26
1.8.1 Эндонуклеазы рестрикции	26
1.8.2 Звездчатая активность рестриктаз.....	28
1.8.3 Применение рестриктаз	28
1.9 Электрофорез	29
1.9.1 Принцип электрофореза	29
1.9.2 Электрофорез в агарозном геле	29
1.9.2.1 Компоненты электрофореза в агарозном геле	30

1.10 Анализ <i>In silico</i>	32
2 Материалы и методы.....	33
2.1 Объекты идентификации	33
2.2 Выделение ДНК.....	33
2.3 Методика проведения электрофореза	36
2.4 Методика проведения ПЦР	37
2.5 Проведение реакции рестрикции.....	38
3 Результаты.....	40
3.1 Проведение анализа <i>in silico</i>	40
3.2 Выделение ДНК из биомассы бактерий.....	40
3.3 Получение ампликонов гена 16S рРНК	40
3.4 Проведение реакций рестрикции	40
3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных.....	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	41
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	42
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	43

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии – одна из древнейших групп организмов. Существуют на земле около 3,5 млрд. лет. Распространены повсеместно: в почве, воде, воздухе, многие из них являются естественными обитателями микрофлоры человека и животных [14]. Однако, в результате смены экологической ниши такие бактерии могут вызывать гнойно-воспалительные процессы, особенно на фоне иммунодефицита. Оперативные вмешательства зачастую сопровождаются бактериальными инфекциями. В медицинских учреждениях порой распространены госпитальные штаммы микроорганизмов, главной причиной появления которых является широкое и не всегда рациональное применение антибиотиков. Распространение и персистенция данных штаммов происходят вследствие недостаточно эффективных мер инфекционного контроля, так же инфицированию подвергаются инструменты: протезы, сосудистые катетеры. Различные внутрисосудистые и имплантируемые устройства (клапаны, шунты) также могут инфицироваться. Пациент, попадая в стационар и подвергаясь различным медицинским процедурам, неизбежно колонизируется госпитальными микроорганизмами, которые при неблагоприятном стечении обстоятельств вызывают развитие инфекционных осложнений [27]. В таком случае назначаются антибиотики, как правило, широкого спектра действия. Без проведения анализов и выяснения возбудителя инфекции. Во избежании возникновения резистентности, необходимо провести анализы и определить против какого микроорганизма нужен препарат. Очень важно уметь точно и быстро идентифицировать микроорганизм для своевременного начала лечения и для проведения грамотной антибактериальной терапии.

Актуальность работы

Ранее идентификация и характеристика видов бактерий в основном проводилась традиционными методами, основанными на фенотипических и биохимических признаках. Такие методы требуют затрат по времени, как правило 7-14 дней.

В последнее десятилетие возможности для идентификации бактерий существенно расширились в связи с применением молекулярно-генетических методов. Этот подход в наши дни является основным.

Наибольший прогресс был достигнут благодаря секвенированию различных маркерных генов. Зачастую для идентификации применяют гены, кодирующие 16S и 23S рРНК, так как они содержатся во всех бактериальных клетках и являются специфичными для большинства микроорганизмов. Применение гена 16S рРНК для идентификации может позволить различать близкородственные виды и подвиды микроорганизмов.

Метод рестрикционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК служит одним из наиболее быстрых и перспективных методов идентификации. Используя данный метод результат возможно получить в течение дня. Он менее чувствителен к загрязняющим примесям по сравнению с секвенированием.

Цель данной работы: Используя метод рестрикционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК осуществить идентификацию представленных образцов бактерий.

Для достижения заданной цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Провести анализ *in silico* ампликонов 500F-1350R и 8F-1492R гена 16S рРНК с использованием баз данных GenBank, и построить теоретические электрофореграммы.

2. Из биомассы образцов почвенных бактерий выделить ДНК и получить ампликоны гена 16S рРНК используя пары праймеров 500F-1350R и 8F - 1492R.

3. Для полученных ампликонов провести реакции рестрикции используя следующий набор рестриктаз: Sse9 I, Hae III, Rsa I, Msp I, Fat I, Tag I, Tru9 I, BstHI I.

4. Провести электрофорез продуктов рестрикции, проанализировать полученные электрофореграммы.

5. Сравнить теоретические и практические электрофореграммы и идентифицировать бактерии.

1 Обзор литературы

1.1 Генетический аппарат бактерий

Наследственная информация у бактерий закодирована в геноме, который представлен нуклеоидом и плазмидами - внехромосомными факторами наследственности, а также входящими в их состав мобильными генетическими элементами, к которым относятся IS-последовательности, транспозоны и интегроны. Каждая генетическая структура (нуклеоид, плазида) способная к самостоятельной репликации, составляет единицу репликации – репликон.

Нуклеоид бактерий представляет собой двухцепочечную молекулу ДНК, что позволяет отнести бактерий к гаплоидным организмам. Возможны некоторые исключения, например *Vibrio cholera* содержит две кольцевидные хромосомы размером 2,69 и 1,07 $\times 10^6$ п.о. Длина нуклеоида достигает 1 мм. Диаметр молекулы ДНК составляет около 2 нм., молекулярная масса в пределах (1-3) $\times 10^9$ Д. Нуклеоид бактерий содержит до 3-5 млн. пар нуклеотидов, которые формируют до 4 тыс. генов. Гены бактериальной хромосомы кодируют жизненно важные для бактерии функции питания, дыхания, роста и размножения [68].

Нуклеоид бактерий, несмотря на отсутствие кариолеммы, четко отделен от цитоплазмы и занимает в ней центральную область [17]. При электронной микроскопии нуклеоид выглядит в виде менее плотных участков центральной части клетки.

Генетические признаки микроорганизмов могут кодироваться не только бактериальной хромосомой, но и плазмидами. Плазмиды – внехромосомные факторы наследственности, представляющие собой небольшие кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, располагающиеся в цитоплазме и способные к автономной репликации. По размерам плазмиды обычно составляют 0,1-5% нуклеоида. Молекулярная масса порядка 10^6 - 10^8 Д и содержат 10^3 - 10^6 п.н., формирующих 40-50 генов. В плазмидах закодирована информация, необходимая для их репликации в бактерии-хозяине, а так же информация о дополнительных признаках, сообщающих бактериям преимущества в определенных условиях обитания и в стрессовых ситуациях. Одна клетка может содержать несколько плазмид, например, *Borrelia burgdorferi* B13 содержит около 17 плазмид. Так же плазмиды могут интегрироваться в бактериальную хромосому. Репликация плазмид начинается со связывания с интероном – белком, иницирующим репликацию. При утрате плазмид основные свойства клетки не изменяются [56,64].

В соответствии с кодируемыми признаками выделяют следующие группы плазмид:

F-плазмиды (англ. *fertility* - плодовитость) контролируют синтез F-пилей (половых ворсинок), способствующих непосредственному контакту бактерий-доноров с бактериями-реципиентами. Такой контакт играет ведущую роль в передаче генетического материала при конъюгации бактерий.

R-плазмиды (от *resistance* - устойчивость) содержит гены, детерминирующие устойчивость к антибиотикам. Передача этих плазмид от одних бактерий к другим способствует возникновению антибиотикоустойчивых штаммов патогенных и условно-патогенных бактерий.

Tox-плазмиды (плазмиды токсигенности) контролируют свойства патогенности бактерий. Нередко плазмидные *tox*⁺ - гены кодируют синтез интактных протоксинов (например, дифтерийного, ботулинического токсинов), активируемых клеточными протеазами, образование которых контролируют гены бактериальных хромосом [26]. К плазмидам патогенности относят такие плазмиды как Ent-плазмиды, кодирующие синтез энтеротоксинов, Нлу-плазмиды, детерминирующие синтез гемолизинов.

Col-плазмиды (англ. *Colicinogeny* - колициногенность) определяют синтез колицинов (бактериоцинов), которые подавляют рост и размножение чувствительных к ним бактерий.

D-плазмиды (плазмиды биодegradации) кодируют синтез ферментов деградации различных соединений (мочевины, толуола, камфоры), необходимых бактериям в качестве источников углерода и энергии [21,30].

1.2 Ген 16S рРНК

В 1977 году Carl Woese и его коллеги предложили последовательность гена 16S рРНК для филогенетических исследований и, основываясь на этой последовательности, представили Древо Жизни, состоящее из трех доменов живых организмов, то есть архей, бактерий и эукариот. Бактериальные гены 16S рРНК расположены внутри оперонов рРНК, которые также содержат гены 23S рРНК, 5S рРНК, тРНК и связанные межгенные спейсерные области. Хотя последовательности ДНК различных генов рРНК и межгенных спейсерных областей использовались для идентификации на уровне рода или вида, обычно, предпочтительным является ген 16S рРНК [46]. Объясняется это следующими обстоятельствами: его универсальностью (наличию в любом геноме, кроме вирусного), мультикопийностью (способствует его легкому обнаружению), наличию обширной мировой базы данных по разнообразию этого гена, которая постоянно пополняется новыми видами [54]. Ген 16S рРНК имеет размер около 1500 п.н. и содержит 9 переменных областей, перемежающихся с высококонсервативными последовательностями (рисунок 1) [41].

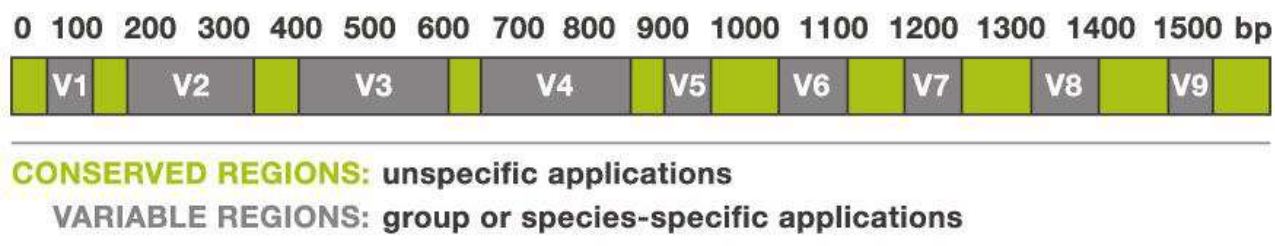


Рисунок 1. Области гена 16S рРНК [41]

Использование гена 16S рРНК позволяет легко ориентироваться на широкий спектр бактерий для классификации и филогенетического анализа [42].

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК известны для большого количества бактерий и представлены в свободном доступе в основных генетических базах данных [70]. Выявленные последовательности изучаемых микроорганизмов сравнивают с присутствующими в базах данных и таким образом идентифицируют вид бактерий или объявляют ее принадлежащей к очередному ещё неизученному виду. В последние годы идет интенсивный пересмотр старой, фенотипической классификации бактерий, которая основана на плохо формализуемых критериях – от внешнего вида колоний до способности окрашиваться различными красителями. Новая систематика основывается на молекулярных критериях и только лишь от части повторяет фенотипическую [45].

1.3 Бактерии, возможные возбудители заболеваний

1.3.1 *Escherichia coli*

Кишечную палочку относят к роду *Escherichia*, семейству *Enterobacteriaceae*.

Эшерихии представляют собой полиморфные прямые или немного изогнутые палочки с закругленными концами. Размеры средние, длина 2-6 мкм, ширина 0,4-0,6 мкм. Располагаются палочки одиночно, реже – попарно. Спор не образуют, клетки *E.coli* имеют пили (фимбрии) и обладают подвижностью благодаря перитрихально расположенным жгутикам. Грамотрицательные, в мазках под микроскопом располагаются беспорядочно. Многие штаммы имеют микрокапсулу. Аэробы или факультативные анаэробы.

Оптимальная температура роста 35-37°C. Хорошо растут на простых питательных средах. В жидких средах создают равномерное помутнение, иногда образуют незначительный осадок.

Характерным признаком эшерихий является ферментация лактозы.

В окружающей среде эшерихии достаточно устойчивы. При 60°C они погибают в течении 15 минут, при 100°C – моментально. В воде, почве сохраняют жизнеспособность месяцами. Прямой солнечный свет вызывает гибель эшерихий через несколько минут.

Эшерихии чувствительны к большинству дезинфицирующих веществ (формальдегиду, препаратам хлора, гидроксиду натрия и др.) и антибиотиков (тетрациклинам, аминогликозидам, рифампицину и др.). Однако они способны быстро приобретать устойчивость к антимикробным препаратам в основном за счет приобретения R-плазмид.

E.coli является нормальным обитателем дистального отдела кишечника человека и теплокровных животных и важной частью кишечной микрофлоры, поддерживающей нормальное физиологическое состояние у здоровых людей. Однако в некоторых случаях эшерихии могут проникать в другие

экологические ниши (например, в мочеполовую систему, в желчные пути, органы дыхания и др.). В результате смены экологической ниши такие бактерии могут вызывать гнойно-воспалительные процессы, инфекции разной локализации, например перитонит, простатит, а также восходящие инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) особенно на фоне иммунодефицита [10,29,23]

Эшерихии относятся к санитарно-показательным микроорганизмам. Наличие кишечной палочки в воде, на пищевых продуктах, в почве, предметах обихода свидетельствует о фекальном загрязнении объектов внешней среды.

1.3.2 *Klebsiella pneumonia*

K. pneumonia относится к семейству *Enterobacteriaceae*. Это грамотрицательная покрытая капсулой бактерия. Полисахаридная капсула придает бактерии устойчивость к фагоцитозу, обеспечивает резистентность к антимикробным пептидам. Короткие толстые палочки, могут иметь эллипсоидную форму, располагаются одиночно, парами или цепочками. Спор и жгутиков не имеют, но есть фимбрии (пили), которые обеспечивают высокую адгезивную способность к клеткам эпителия. Антигены фимбрий высоко иммуногенны.

Факультативные анаэробы. Хорошо растут на простых средах, дают рост слизистых, куполообразных колоний. На жидких средах образуют помутнение, иногда пленку. Оптимум температуры – 35-37°C, рН среды – 7,2.

Распространены повсеместно, включая почву, воду и животных. Могут контаминировать различные объекты в учреждениях здравоохранения, в том числе оборудование. При 24°C представители *Klebsiella* сохраняются неделями и месяцами. В пробах пыли возбудитель сохраняет жизнеспособность до 2,5 года.

K. pneumonia становится все более высоковирулентной и достаточно быстро приобретает устойчивость к антибактериальным препаратам. На данный момент *K. pneumonia* считается наиболее частой причиной тяжелых нозокомиальных пневмоний. [12,33,18]

1.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa – это грамотрицательные, прямые палочки размером 1-3 мкм, не образующие спор. Палочки расположены одиночно, попарно или в виде коротких цепочек в мазках чистых культур. В нативных препаратах бактерии подвижны за счет наличия одного, реже двух жгутиков. Облигатный аэроб, хорошо растет на простых питательных средах, при температуре от 4 до 42°C, что позволяет длительно сохраняться в окружающей среде и противостоять защитным силам организма человека и животных.

Поверхность бактерий покрыта микроворсинками. Иногда могут продуцировать капсулоподобную внеклеточную слизь, покрывающую тонким слоем микробную клетку, более вирулентные штаммы синтезируют повышенное ее количество, так называемые мукоидные штаммы, секретируют

это вещество более интенсивно, что дает основание рассматривать слизь как фактор патогенности.

P. aeruginosa – выраженный хемоорганотроф, аэроб, факультативный анаэроб, метаболизм дыхательный. Каталаза – положительна, синтезирует цитохромоксидазу, а оксидазный тест является одним из ведущих при идентификации синегнойной палочки.

Патогенные свойства обусловлены образованием веществ, проявляющих свойства экзотоксинов и высвобождением эндотоксинов при гибели и распаде бактериальных клеток.

P. aeruginosa встречается также как часть нормальной, естественной микрофлоры человека. У здоровых людей синегнойную палочку выявляют на коже паха, подмышечных областях и ушей (до 2% лиц), на слизистой оболочке носа (до 3%) и глотки (до 7%), в желудочно-кишечном тракте (3-24%). Однако распространенность колонизации здоровых людей вне поликлиники относительно мала.

Синегнойные бактерии широко распространены в природе. Их обнаруживают в воде, почве, на растениях, на коже, в кишечном тракте человека и животных, испражнениях теплокровных животных.

P. aeruginosa относится к бактериям, которые в естественных условиях патогенны для человека, животных и растений [10].

При наличии достаточного количества питательных веществ данный микроорганизм может оставаться жизнеспособным в анаэробных условиях до двух недель. Проявляет устойчивость к дезинфицирующим средствам, обладает высокой природной резистентностью к широкому кругу антибиотиков, использует в качестве источника питания нитрофурановые растворы.

Выраженная патогенность синегнойной палочки связана с наличием у нее ряда факторов вирулентности, способствующих колонизации и инфицированию тканей организма человека. К детерминантам вирулентности относятся факторы, способствующие адгезии, инвазии, цитотоксичности.

В любом случае *P. aeruginosa* – возбудитель с высоким эпидемическим потенциалом и исключительными адаптационными свойствами, поэтому необходимо изолировать больных в отдельную палату и соблюдать меры предосторожности, для предупреждения распространения инфекции [19,11]

1.3.4 *Staphylococcus spp.*

Стафилококки относятся к семейству *Staphylococcaceae* и роду *Staphylococcus*. Клинически значимыми для человека являются следующие виды: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus intetrmedius* и некоторые другие.

Представители данного рода имеют шаровидную форму, диаметр клеток 0,5-1,5 мкм. В мазках из культур, выросших на питательных средах, стафилококки формируют скопления, напоминающие виноградные грозди.

Положительно окрашиваются по граму, спор не образуют, неподвижны. Некоторые могут образовывать микрокапсулу, которая препятствует фагоцитозу, но способствует адгезии бактерий к клеткам организма. Микрокапсула обнаруживается у 70% штаммов *Staphylococcus*.

Стафилококки это факультативные анаэробы, хорошо растут в аэробных условиях при температуре 35-40°C и рН 7,0-7,5 на простых питательных средах. Являются представителями галофильных бактерий.

Стафилококки достаточно устойчивы во внешней среде. В пыли сохраняются до 100 дней, в гное – до 200 дней. Прямой солнечный свет убивает их за 10-12 часов. При температуре 150°C стафилококки погибают через 10 минут. Чувствительны к большинству дезинфицирующих средств, а также чувствительны к анилиновым красителям и йоду, что позволяет использовать эти препараты местно для лечения стафилококковых пиодермий.

Широко распространены в окружающей среде. Они являются представителями нормального микробиоценоза кожи и слизистых оболочек носа, ротовой полости, зева, половых органов. На коже человека доминирующим видом является *S. epidermidis*. Эпидермальный стафилококк может быть причиной гнойно-воспалительных процессов при снижении общей резистентности организма у лиц пожилого возраста, новорожденных, пациентов стационаров в послеоперационном периоде. *S. epidermidis* является одним из возбудителей внутрибольничных инфекций. Особенно часто эпидермальный стафилококк инфицирует сосудистые катетеры и протезы. Внутрисосудистые и имплантируемые устройства (катетеры, шунты, клапаны и др.) подвержены отложению на их поверхностях белков внеклеточного матрикса (фибриногена, фибронектина и др.). Это создает благоприятные условия для адгезии коагулазоотрицательных стафилококков. После адгезии они с помощью синтезируемых экзополисахаридов быстро формируют биопленку, в составе которой микробные клетки защищены от действия повреждающих факторов макроорганизма и антибактериальных препаратов. Отдельные виды стафилококков проявляют своеобразный тропизм к различным участкам кожи. Так, *S. capitis* преобладает на волосистой части головы, *S. epidermidis* – на коже лица, *S. auricularis* – в области наружного слухового прохода, *S. hominis* – в подмышечных впадинах, в области промежности, на коже конечностей и туловища. *S. saprophyticus* способен вызывать гнойные осложнения в послеоперационном периоде. Сапрофитный стафилококк часто является причиной инфекций мочевыводящих путей, так как обладает повышенной способностью к адгезии на эпителиальных клетках мочевыводящего тракта. Наибольшее значение в этиологии стафилококковых инфекций имеет *S. aureus*. Носителем этого микроорганизма является до 40% взрослых людей. Золотистый стафилококк заселяет передние отделы носовых ходов (внутреннюю поверхность крыльев носа) у 70-90% здоровых лиц, при этом у 20-30% здоровых людей он может выделяться в течение продолжительного времени. Высокий уровень носительства золотистого стафилококка отмечается у персонала больниц и пациентов стационаров. У

здоровых людей *S. aureus* чаще всего вызывает развитие пиодермий. Слизистые оболочки поражаются золотистым стафилококком редко.

Заболевание может иметь как эндогенный, так и экзогенный характер. Эндогенная стафилококковая инфекция развивается при снижении естественной резистентности макроорганизма. В этом случае представители нормального микробиоценоза вызывают развитие патологического процесса в разных биотопах организма. Экзогенная стафилококковая инфекция в настоящее время часто регистрируется как инфекция, связанная с оказанием медицинской помощи [35,20].

1.3.5 *Enterobacter spp.*

Род *Enterobacter* объединяет грамотрицательные прямые подвижные палочки размером 1,2-3,0×0,6-1,0 мкм. Единственный неподвижный вид – *E. asburiae*. Факультативные анаэробы, хемоорганотрофы, метаболизм дыхательный и броидильный. Спор не образуют. Согласно IX изданию «Определителя бактерий Берджи» (1994), род насчитывает 13 видов.

Типовой вид – *E. cloacae*. Широко распространены в природе: бактерии выделяют из воды, сточных вод, с растений, из фекалий животных и человека. Доказана патогенность энтеробактеров для некоторых насекомых.

Подвижные бактерии а мазках располагаются одиночно, реже – короткими цепочками, некоторые штаммы снабжены капсулой. Энтеробактерии хорошо растут на простых питательных и селективно-дифференциальных средах. Температурный оптимум 30-37°C, оптимум pH-7,2. Все энтеробактеры отличаются высокой устойчивостью к дезинфицирующим средствам. Из 7 видов энтеробактеров, выделяемых из организма человека (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. sakazakii*, *E. gergoviae*, *E. amnigenus*, *E. tayloraе*) поражения наиболее часто вызывают первые два вида. Основные факторы патогенности – микроворсинки, облегчающие колонизацию, и эндотоксин.

Информация о конкретных нозологических формах поражений, вызываемых энтеробактериями, крайне скудна. Энтеробактер встречается в толстом кишечнике многих здоровых людей, но он относится к условно-патогенным бактериям, и при попадании энтеробактера в другие органы возможно развитие инфекционных заболеваний. Ряд видов *Enterobacter* (*E. agglomerans*, *E. cloacae* и др.) вызывают инфекционные заболевания почек и мочевыводящих путей (острый пиелонефрит, обострение хронического простатита), половых органов, респираторной системы, острые желудочно-кишечные заболевания, гнойничковые поражения кожи, инфекционное воспаление мозговых оболочек, септицемию, внутрибольничные инфекции. Энтеробактеры выделяются из мочи, кала, крови, макроты, спинно-мозговой жидкости, плевральной жидкости, с поверхности кожи, из желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы. Тяжелые заболевания у человека могут вызывать почти все представители рода *Enterobacter*. [24,5].

1.3.6 *Enterococcus spp*

Энтерококки относятся к семейству *Streptococcaceae*, роду *Enterococcus*. Клиническое значение имеют виды *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. gilvus*, *E. pallens*.

Энтерококки представляют собой овальные клетки размерами 0,6-2,0 × 0,6-2,5 мкм. Грамположительные, в мазках располагаются парами или небольшими цепочками. Спор и капсул не образуют, по большей части неподвижны, однако некоторые виды могут содержать от 1 до 4 жгутиков.

Энтерококки – факультативные анаэробы, хорошо растут на простых питательных средах, образуя мелкие серовато-белые колонии. Оптимальная температура роста 35-37°C. Способны расти на средах, содержащих 6,5% хлористого натрия. У представителей данного вида выражены редуцирующие свойства: изменяют окраску молока с метиленовым синим. Различные углеводы расщепляются энтерококками до кислоты без газа. Каталазоотрицательные. Все штаммы продуцируют фермент лейцинаминопептидазу. Устойчивы к различным факторам внешней среды и дезинфицирующим средствам, способны длительное время сохраняться на предметах домашнего обихода, выдерживают нагревание до 60°C в течение 30 минут.

Энтерококки являются представителями нормальной микрофлоры ротовой полости, кишечника и мочеполовой системы человека. Они имеют большое значение в обеспечении колонизационной резистентности слизистых. Основными представителями микробиоты кишечника человека являются *E. faecalis* (90-95%) и *E. faecium* (5-10%). *Enterococcus*, за счет своей способности продуцировать короткие пептиды – энтероцины, обладают выраженной антагонистической активностью в отношении кишечных палочек и стафилококков. Инфекции, вызываемые энтерококками, носят чаще всего эндогенный характер. Энтерококки вызывают оппортунистические инфекции при существенном снижении резистентности организма-хозяина, особенно при травмах мочеполового тракта, кишечника или в результате инструментального обследования. В этих случаях бактерии проникают в стерильные, в нормальных условиях, органы и ткани и вызывают развитие инфекций, таких как остеомиелит, инфекции кожи и мягких тканей, инфекции мочевыводящих путей, эндокардит, бактериемию, септический артрит, сепсис и другие заболевания. Они способны инфицировать ожоговые раны и имплантированные устройства.

Энтерококки обладают природной устойчивостью к большинству антибиотиков, особенно к β-лактамам антибиотикам и аминогликозидам. В санитарной микробиологии энтерококки относятся к группе санитарно показательных микроорганизмов [20, 25].

1.3.7 *Streptococcus spp*

Стрептококки относятся к семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*.

Род *Streptococcus* включает большое количество видов, среди которых клинически значимыми для человека являются *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *S. agalactiae*, *S. mitis* и некоторые другие.

Стрептококки представляют собой положительно окрашивающиеся по граму клетки сферической формы и размером около 0,5-2,0 мкм. Спор не образуют, неподвижны. Некоторые виды способны формировать капсулу. Имеют пили. В мазках из агаровых культур располагаются цепочками.

Стрептококки – факультативные анаэробы. Хорошо растут в аэробных условиях на питательных средах с глюкозой, кровью, сывороткой крови. На плотных средах формируют мелкие сероватые колонии. В жидких средах растут в виде небольшого осадка.

Протеолитическими свойствами не обладают. Каталазоотрицательные.

Во внешней среде стрептококки сохраняются в течение нескольких дней. Они выдерживают нагревание до 50-70°C в течение 30 минут, хорошо переносят низкие температуры. Способны длительное время сохраняться на предметах окружающих больного, в пыли и мокроте стрептококки сохраняются месяцами. Обладают чувствительностью к пенициллину, к другим антибиотикам и сульфаниламидам у стрептококков часто развивается резистентность. Чувствительны к дезинфектантам.

Streptococcus широко распространены в природе. Они относятся к нормальной микрофлоре слизистых оболочек дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, часто колонизируют кожные покровы человека и животных. Стрептококки постоянно обитают в ротовой полости, носоглотке, толстом кишечнике, влагалище. При проникновении в первично стерильные области организма они способны вызывать инфекционные заболевания. Среди стрептококков наибольшее клиническое значение имеют следующие виды: *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. agalactiae*, *S. anginosus*.

S. pyogenes обнаруживается на слизистой оболочке переднего отдела носа, носоглотки, миндалин, является патогенным для человека вызывает гнойно-воспалительные заболевания кожи и подкожной клетчатки, ангину, скарлатину, ревматизм, гломерулонефрит и другие заболевания.

S. pneumoniae (пневмококк), обнаруживается на слизистой оболочке верхних отделов респираторного тракта, является возбудителем крупозной пневмонии, менингитов, отитов, конъюнктивитов, сепсиса.

S. mitis, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans* являются условно-патогенными микроорганизмами, колонизируют ротовую полость, участвуют в образовании зубных бляшек и в развитии кариеса. Они синтезируют гликозилтрансферазу – фермент, который превращает сахарозу в декстран, способствующий адгезии стрептококков к зубной эмали.

S. agalactiae в основном колонизирует слизистую оболочку влагалища у женщин. Так же встречается на коже и слизистой оболочке дыхательных путей. Способен вызывать тяжелые эндометриты, менингиты и сепсис у новорожденных.

S. anginosus служит возбудителем респираторных инфекций и заболеваний мочеполовой системы [20, 34].

1.3.8 *Bacteroides spp*

Бактероиды относятся к семейству *Bacteroidaceae*, роду *Bacteroides*. Род *Bacteroides* объединяет более 10 видов. Клиническое значение имеют виды *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*.

Бактероиды представляют собой грамотрицательные палочки, которые отличаются высоким полиморфизмом. Клетки бактериоидов могут быть кокковидной, палочковидной или ветвящейся формы размером 1-3 × 0,5-0,8 мкм. В мазке располагаются одиночно, парами, небольшими цепочками. Спор не образуют, некоторые виды имеют полисахаридную капсулу. Одни виды являются неподвижными, другие виды имеют перитрихально расположенные жгутики.

Бактероиды являются облигатными анаэробами. Культивируются на обогащенных питательных средах: кровяном агаре, на средах с добавлением яичного белка, желчи, эскулина, тканевых экстрактов (мозгового, сердечного). Лучше растут в атмосфере 10% углекислого газа при температуре 37°C. *B. fragilis* образует каталазу и супероксиддисмутазу, поэтому является аэротолерантным микроорганизмом. Культивирование бактериоидов в анаэроштатах. Размножение протекает медленно, посеы инкубируют в течение 2-5 дней. На плотных питательных средах бактериоиды образуют мелкие жемчужно-серые или белые колонии.

При попадании на воздух бактериоиды погибают в течение короткого времени. Они устойчивы к пенициллинам, цефалоспорином I и II поколений, аминогликозидам (стрептомицину, гентамицину, канамицину, мономицину), тетрациклину. Бактероиды чувствительны к действию обычно применяемых в клинической практике антисептиков и дезинфектантов.

Бактероиды являются антагонистами шигелл, сальмонелл, некоторых видов эшерихий. Они участвуют в процессах разложения углеводов, белков и биотрансформации желчных кислот.

Бактероиды являются представителями нормальной микрофлоры кишечника, мочеполовых органов, верхних дыхательных путей, полости рта. Основное место обитания в организме человека – толстая кишка. В стерильных внутренних органах здоровых людей они отсутствуют.

Патология, обусловленная бактериоидами, развивается чаще всего как эндогенная инфекция в результате повреждения слизистых оболочек – мест обитания этого микроба. При развитии патологических процессов выявляются ассоциации бактериоидов с другими анаэробными, а также с аэробными и

факультативно-анаэробными бактериями (кишечной палочкой, стрептококками, стафилококками, синегнойной палочкой). Однако *B. fragilis* способен вызывать моноинфекции.

Бактероиды вызывают различные гнойно-воспалительные заболевания после травм, оперативных вмешательств, при онкологических заболеваниях. Инфекции бактериальной этиологии возникают обычно у лиц с иммунодефицитами. Часто бактериоиды являются причиной воспалительных заболеваний женских половых органов (цервицитов, эндометритов, аднекситов). У мужчин бактериоиды обнаруживаются при простатитах, хронических уретритах [22, 32].

1.4 Метод Масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS)

MS получает все более широкое применение в медицине: разработка новых лекарственных средств, контроль их производства, геноинженерия и биохимия, протеомика. В клинических лабораториях метод находит применение для выявления большинства стероидных гормонов и определения уровня аминокислот и ацилкарнитинов [16]. MS позволяет идентифицировать белки, определять их структурные изменения вследствие различных взаимодействий при их воспроизводстве, определять пути метаболизма лекарственных средств и других соединений и идентифицировать метаболиты, разрабатывать новые лекарственные средства.

Находит MS применение и в микробиологии для идентификации микроорганизмов. MS наиболее эффективна при анализе нуклеиновых кислот, специфических белков и пептидов бактерий.

Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов основана на определении уникального для каждого вида микроорганизмов набора белков – своеобразный «отпечаток пальца» микроорганизма. Идентификация осуществляется в основном по рибосомальным белкам.

Сущность метода заключается в ионизации, т.е. превращении, с помощью лазерных импульсов, органического вещества микроорганизмов в заряженные частицы – ионы. При этом молекулы вспомогательного вещества матрицы (α -циано-4-гидроксикоричневая кислота), и изучаемого микроорганизма переходят в газовую фазу, а молекулы матрицы взаимодействуют с белками и переносят на них положительный заряд. Полученные в результате ионизации ионы с помощью электрического поля переносят в газовую фазу вакуумной части масс-спектрометра. В глубоком вакууме анализатора под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам. Так происходит сортировка заряженных ионов по массам (а именно, по отношению массы к заряду) по времени пролета ими определенного расстояния. После попадания ионов на детектор и оцифровки результата программа масс-анализатора оценивает время пролета частиц, строится масс-спектр – график, по оси абсцисс находится соотношение m/z , а по оси ординат –

количество ионов, зарегистрированных детектором в конкретный момент времени. Полученный масс-спектр сопоставляется со спектрами из базы данных масс-анализатора, и на основании сведений о массах характеристических белков осуществляется идентификация микроорганизмов.

Для проведения MALDI-TOF MS идентификации возбудителей требуется масс-спектрометр, соответствующая программа и база данных.

Методика проведения идентификации проста и состоит из двух этапов: подготовки исследуемой чистой культуры культуры микроорганизма и собственно идентификации.

Подготовка культуры. На подложке масс-анализатора смешивают идентифицируемые микроорганизмы (взятые из чистой культуры, отдельной колонии, среды обогащения) и раствор матрицы. Для подготовки 24 культур требуется 10 минут.

Идентификация культуры. Подготовленную культуру помещают в масс-анализатор и подвергают воздействию лазерных импульсов. Далее процесс идентификации осуществляется с помощью масс-спектрометра автоматически. Идентификация культуры одного микроорганизма завершается менее чем за 2 минуты. Для идентификации 24 культур потребуется 12 минут [28, 6, 43].

1.5 Полимеразная цепная реакция

Появлению полимеразной цепной реакции предшествовал ряд событий. В 1955 году А. Корнберг открыл фермент, который назвал ДНК-полимеразой. Этот фермент способен удлинять цепь ДНК, катализируя присоединение нуклеотидов к ее 3'концу. В искусственных условиях фермент катализирует реакцию достраивания участка искомой ДНК от затравки (праймера), которая комплементарно связана с цепью ДНК. Раствор, в котором происходит эта реакция, должен содержать дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTPs), которые служат строительными блоками.

В 1971 г. Х. Клеппе и соавторы рассмотрели данные, касающиеся состава ингредиентов реакционной смеси, и принципы использования коротких искусственно синтезированных молекул ДНК-праймеров для получения новых копий ДНК. Однако возможность использования ПЦР в плане наработки большого количества копий целевых фрагментов нуклеиновых кислот еще не рассматривалась. Это было связано с техническими трудностями, обусловленными необходимостью трудоемкого синтеза праймеров и нестабильностью фермента. В начале использования метода ПЦР после каждого цикла нагревания и охлаждения ДНК-полимеразу приходилось добавлять в реакционную смесь, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спирали ДНК. Процедура была очень неэффективной, требовала много времени и фермента.

В 1975 г. Т. Брок и Х. Фриз открыли *Thermus aquaticus* – граммотрицательную экстремально термофильную палочковидную бактерию, а в 1976 г. из нее была впервые выделена *Taq*-полимераза. Преимуществом

данного фермента являлась способность стабильно работать при повышенных температурах (оптимум 72-80°C).

В 1983-1984 гг. К. Мюллис провел ряд экспериментов по разработке ПЦР и первым начал использовать *Taq*-полимеразу вместо неустойчивых к высоким температурам ДНК-полимераз. Это позволило ускорить работы по разработке ПЦР. Помимо того, К. Мюллис вместе с Ф. Фалуном разработали алгоритм циклических изменений температуры в ходе ПЦР.

Таким образом, сформировался принцип использования ПЦР как метода амплификации *in vitro* заданных фрагментов ДНК с полностью или частично известной последовательностью. В настоящее время предложены различные модификации ПЦР, продемонстрирована возможность создания тест-систем для обнаружения микроорганизмов, выявления точечных мутаций, описаны десятки различных применений метода.

Открытие метода ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последнее десятилетие. Это позволило поднять медицинскую диагностику на качественно новый уровень [15, 8].

1.5.1 Этапы и компоненты ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – искусственный процесс многократной амплификации заданной последовательности ДНК, осуществляемый *in vitro*. Копирование ДНК при ПЦР осуществляется ферментом ДНК-полимеразой, точно так же как это происходит и в клетках живых организмов при репликации ДНК. ДНК-полимераза, двигаясь по одиночной цепи ДНК-матрицы, синтезирует комплементарную ей последовательность в виде дополнительной цепи. ДНК-полимераза не способна начать синтез цепи ДНК *de novo*, для этого ей необходима короткая затравочная цепь со свободной 3'-ОН группой, к которой она сможет начать присоединять нуклеотиды. Основным принципом ПЦР состоит в том, что реакция полимеризации инициируется праймерами – короткими фрагментами затравочной НК в каждом из множества повторяющихся циклов.

Специфичность ПЦР определяется способностью праймеров узнавать строго определенный участок ДНК и связываться с ним согласно принципу молекулярной комплементарности [37,38]. В обычной реакции ПЦР используется пара праймеров (прямой и обратный), которые ограничивают амплифицируемый участок с двух сторон, связываясь с противоположными концами противоположных цепей ДНК матрицы. Для многократного увеличения количества копий исходной ДНК необходима цикличность реакции. Как правило, каждый из последовательно повторяющихся циклов ПЦР состоит из трех этапов:

- Денатурации (плавления) ДНК, когда двухцепочечная молекула ДНК под воздействием высокой температуры распадается на две цепочки;
- Связывания (отжига) праймеров с матричной ДНК;
- Элонгации (удлинения) цепи [65].

Смена этапов каждого цикла происходит за счет изменения температуры реакционной смеси. Изначально праймеры могут связаться только с определенной последовательностью исходной ДНК, но в последующих циклах они связываются с «половинками» копий этой последовательности, синтезированных в предыдущих циклах. Количество основного продукта ПЦР теоретически удваивается в каждом цикле, то есть растет с числом циклов экспоненциально.

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

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

Для удобства детекции и контроля эффективности амплификации в состав реакционной смеси могут быть включены дополнительные компоненты:

- Положительный контрольный образец (ПКО) представляет собой искусственно синтезированную олигонуклеотидную последовательность, строго соответствующую искомой. Соответственно, праймеры для ПКО и искомой мишени одинаковые, что позволяет удостовериться в работоспособности и сохранности компонентов реакционной смеси (РС), необходимых для нормального прохождения ПЦР;

- Отрицательный контроль (ОКО) включает в себя все компоненты реакции, но вместо клинического материала или препарата НК вносится соответствующее количество деионизованной воды или экстракта, не содержащего исследуемую ДНК. Отрицательный контроль необходим для проверки компонентов реакции на отсутствие в них ДНК или клеток возбудителя вследствие контаминации и исключения учета ложноположительных результатов;

- Внутренний контроль. Препарат НК может содержать примеси ингибиторов, которые заметно снижают эффективность ПЦР, а в некоторых случаях могут приводить к полному отсутствию результатов исследования. Кроме того, возможны ошибки на этапе составления РС (например, не добавили какой-либо компонент или саму НК), несоблюдение температурного режима хранения наборов реагентов или отдельных их частей (например, размораживание и потеря активности ферментов) и ряд других технических моментов, которые напрямую влияют на результаты ПЦР. Поэтому становится необходимым контролировать ход амплификации в каждой пробирке с

реакционной смесью. Для этого в состав РС вводят дополнительный внутренний контроль (ВК).

ВК – это искусственно сконструированный препарат ДНК или РНК, который имеет принципиально отличную от искомой олигонуклеотидную последовательность. Для ВК в состав РС вводят собственные, строго комплементарные праймеры.

Концентрация ВК в РС должна быть такой, чтобы не составлять конкуренцию для амплификации даже единичных искомых молекул НК.

Наличие ампликонов ВК является свидетельством нормального прохождения реакции амплификации. Если ампликоны искомой НК отсутствуют, но не образовались также ампликоны ВК, можно сделать вывод о технологических нарушениях либо о наличии в анализируемом образце нежелательных примесей. В любом случае результат реакции следует признать недостоверным.

ВК может быть использован не только непосредственно в составе РС для амплификации, но и для контроля качества выделения НК. Для этого его вводят в каждую пробирку с исходным или предварительно обработанным образцом, проводят через этап выделения и только потом добавляют в РС. Введение ВК с известной концентрацией на этапе выделения особенно важно для контроля количественного ПЦР-анализа.

Основное оборудование для проведения ПЦР – амплификатор. Амплификатор – программированный термостат, обеспечивающий периодическое нагревание и охлаждение пробирок, обычно с точностью не менее $0,1^{\circ}\text{C}$. Амплификатор позволяет задавать сложные программы и обеспечивает возможность хранения полученных копий искомой последовательности молекул ДНК при 4°C .

Обычно при проведении ПЦР выполняется 30-35 циклов. Простейший алгоритм ПЦР состоит из следующих этапов:

- Горячий старт. ДНК нагревают до $92-96^{\circ}\text{C}$ в течение 3-х минут. При последующих этапах после денатурации фермент не добавляют, т.к. используется термостабильная ДНК-полимераза;

- Денатурация. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до $94-96^{\circ}\text{C}$ (или до 98°C , если используется особо термостабильная полимераза) на 0,5-2 мин., чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией, так как разрушаются водородные связи между азотистыми основаниями двух цепей;

- Отжиг. Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на $4-5^{\circ}\text{C}$ ниже температуры их плавления. Время стадии – 0,5-2 мин., Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре);

- Элонгация. ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Полимераза начинает синтез второй цепи от $3'$ -

конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы. Температура элонгации зависит от полимеразы. Обычно используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72°C. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным 1 минуте на каждую 1000 пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Время этой стадии 7-10 мин.

После завершения элонгации в данном цикле автоматически включается выполнение второго этапа следующего цикла.

После завершения всех циклов, температура в ячейках амплификатора снижается до 4°C. Данная температура сохраняется до тех пор пока образцы не будут извлечены из амплификатора.

Хранение возможно при температуре 4°C в течение 18 часов [8].

Ниже, на рисунке 1 представлены основные этапы ПЦР.

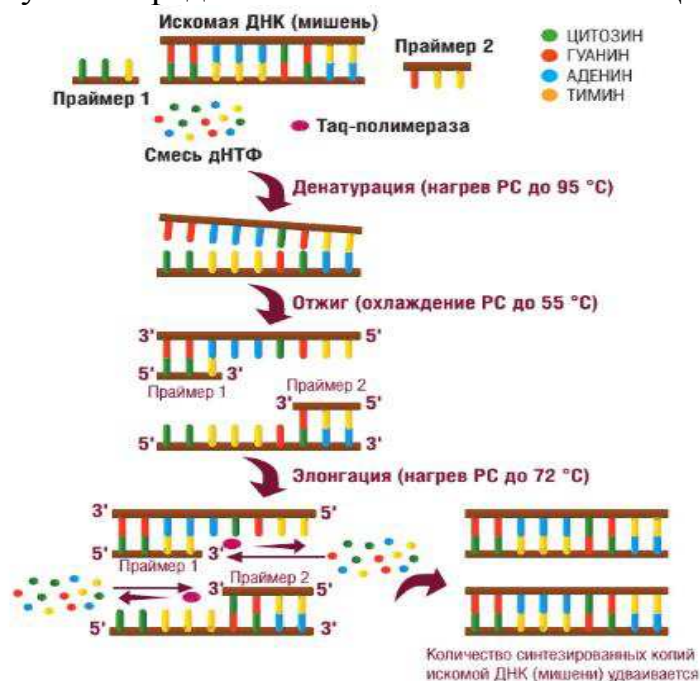


Рисунок 2. Основные этапы ПЦР [37]

1.5.2 Эффект плато

Процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает – проявляется эффект плато.

Термин «эффект плато» используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах амплификации, когда количество ампликонов достигает 0,3-1 пмоль.

На достижение эффекта плато влияют:

- Истощение субстратов (dNTPs и праймеров);
- Стабильность реагентов (dNTPs и фермента);

- Количество ингибиторов (пирофосфаты и ДНК-дуплексы);
- Неспецифические продукты и праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, dNTPs и полимеразу;
- Концентрация специфического продукта за счет неполной денатурации при высокой концентрации ампликонов [15,8].

1.6 Секвенирование

Секвенирование ДНК – это метод определения последовательного расположения оснований нуклеиновых кислот в полинуклеотиде, кодирующем различные белки в живой клетке [58].

Технологии метода химической деградации, предложенные Максамом и Гилбертом, метод дидезокситерминации цепи, разработанный командой Sanger в 1977 г., и автоматическое секвенирование с помеченной флуоресценцией в 1990-х гг. вместе сформировали первое поколение секвенирования (FGS). Благодаря своей сравнительной простоте метод Сэнгера стал доминирующим методом в FGS. Секвенирование Сэнгера позволило секвенировать бактериофаг PhiX 174, который содержит приблизительно 5375 нуклеотидов. В 1977 г. геном этого бактериофага стал первым полностью секвенированным геномом.

Секвенирование второго поколения (SGS) или секвенирование следующего поколения (NGS) относится к высокопроизводительным технологиям секвенирования ДНК, которые могут секвенировать миллионы или миллиарды нитей ДНК. При этом процесс определения последовательности происходит с использованием ферментативной репликации или амплификации, обеспечивающей значительную пропускную способность и многократное секвенирование целевых областей [69].

Секвенирование третьего поколения (TGS) характеризуется путем добавления нуклеотидов по одному для получения длинных и точных результатов секвенирования, в то время как технология амплификации не используется. Одноклеточное секвенирование также характерно для технологии TGS [3].

1.6.1 Секвенирование по Сэнгеру

Секвенирование по Сэнгеру является одним из первых методов секвенирования ДНК. Химическая реакция проводится в 4-ех отдельных пробирках, каждая из которых содержит матричную цепь ДНК, праймеры, ДНК-полимеразу и четыре dNTPs, один из которых радиоактивно помечен. Образец ДНК делится на 4 отдельные реакции секвенирования, содержащие все 4 стандартных дезоксинуклеотида и ДНК-полимеразу. К каждой реакции добавляется только один из 4-ех дидезоксинуклеотидов (ddNTPs), в то время как другие добавленные нуклеотиды являются обычными. После денатурации и отжига праймера фермент ДНК-полимераза начинает добавлять dNTPs во вновь синтезированную цепь ДНК, и, если ddNTPs включается, реакция прекращается. Это приводит к раздельному сбору нитей ДНК разных размеров

во всех 4-ех реакционных пробирках. Результат отдельной реакции затем помещают в отдельные лунки полиакриламидного геля. Радиоактивное пятно указывает на фрагменты ДНК с ddNTP, включенным в определенном положении. Нуклеотидная последовательность в разделяющем геле определяется снизу вверх, а нуклеотидная последовательность в разных полосах терминатора дает шаблон нуклеотидной последовательности [62].

В 1986 году Leroy Hood и его коллеги усовершенствовали метод секвенирования Сэнгера, используя флуоресцентные метки вместо радиоактивных меток. Один из 4-ех флуоресцентных красителей используется для маркировки нуклеотидных праймеров. Каждый краситель используется в отдельной реакции секвенирования с одним из четырех ddNTP. По завершении реакций секвенирования все 4 реакции смешивают и анализируют вместе в одной полосе полиакриламидного геля. Использование 4-ех различных ddNTP, меченных флуоресцентной меткой с 4-мя различными длинами волн, позволяет проводить реакцию секвенирования в одной пробирке вместо 4-ех отдельных реакций. Этот метод был усовершенствован в начале 1990-х гг., когда Harold Swerdlow и его коллеги использовали капилляры в методе секвенирования ДНК. Эти капилляры достаточно маленькие (с внутренним диаметром 50 мкм) и работают с более высокими напряжениями, что бы уменьшить время работы. В 1993 г. В. L. Karger заменил полиакриламид разделительной матрицей с низкой вязкостью; позже в 1995 г. Zhang разработал non-cross-linked полимер, который стабилен даже при 60°C для получения высококачественной последовательности нуклеотидов. Процедура автоматизирована. Генерируемые данные последовательности собираются и анализируются с использованием компьютера. Несмотря на новые открытия секвенаторов следующего поколения, автоматическое секвенирование по Сэнгеру по-прежнему считается «золотым стандартом» из-за его точности и длины чтения. При этом для массового использования данный метод секвенирования медленен и дорог [63, 3].

1.7 Метод рестрикционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК

Традиционный способ идентификации бактерий основан на широком спектре фенотипических характеристик. Организмы разделяли на группы на основе морфологических и физиологических признаков: потребность в питании, условиях роста и многое другое. В настоящее время данные признаки оказались очень похожими для многих видов и утратили свою уникальность. Так же эти способы достаточно трудоемки и требуют большого количества времени (подготовка среды, разведение, посев, инкубация, подсчет, выделение и характеристика), а результаты наблюдаются только через несколько дней, и зачастую получаются ложноположительными, особенно при рассмотрении схожих видов микроорганизмов [44, 40, 47].

В настоящее время все большее значение в лабораторной диагностике придается молекулярно-генетическим методам исследования [2]. Новым шагом в бактериальной систематике стала расшифровка последовательности гена 16S рРНК. Благодаря своей консервативной природе и простоте манипулирования, ген 16S рРНК широко используется для идентификации огромного количества видов бактерий.

Метод рестриционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК- это метод идентификации бактериальных штаммов с использованием уникальных «отпечатков пальцев», основанный на наличии вариаций (полиморфизмов) в гомологичных последовательностях ДНК [44,55].

Полиморфизм ДНК в данном случае это наличие вариабельности в последовательности нуклеотидов в одном и том же гене, выполняющем те же функции, у разных видов. Он вызывается различными причинами: точечными мутациями в виде единичных нуклеотидных замен; ошибками при репликации ДНК в виде инсерций или делеций протяженностью от одного до сотен нуклеотидов; крупными делециями или вставками; транслокациями или транспозициями мобильных генетических элементов. Изменения в первичной структуре ДНК ведут к изменениям в длине фрагментов, образующихся под воздействием рестриктаз.

Определение полиморфного сайта с помощью представленного метода заключается в выделении ДНК, ПЦР-амплификации интересующего фрагмента и его расщеплении соответствующей эндонуклеазой рестрикции. Дальнейшее разделение продуктов рестрикции с помощью электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле и последующее ген-документирование позволяют выявить искомое изменение [59].

Анализ используется для определения риска заболевания, например, в лаборатории «*in vitro*». ПЦР и рестриционный анализ применяются для идентификации полиморфизма генов аполипопротеина E, ангиотензин-конвертирующего фермента, полиморфизмы в этих генах могут быть ответственны за риск болезней сердца; для построения генетических карт родства. Полное совпадение рестриционных картин по нескольким рестриктазам указывает на близкородственность исследуемых образцов.

Благодаря простоте и надежности, дешевизне, метод получил широкое распространение и до сих пор популярен, хотя и имеет некоторые ограничения – он позволяет детектировать только замены, расположенные в сайтах, узнаваемых эндонуклеазой рестрикции. Необходимо подчеркнуть, что несомненным и главным преимуществом метода рестриционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК является возможность быстрого создания на его основе систем тестирования. Метод имеет сравнительную невысокую себестоимость (цена зависит только от цены ферментов), не требует крайне высокой квалификации персонала и дорогостоящего оборудования [9].

1.8 Рестрикция

1.8.1 Эндонуклеазы рестрикции

В 1962 году Арбер выявил особый тип ферментов – рестриктазы, которые способны разрезать молекулы ДНК только в местах (сайтах рестрикции), где имеется определенная последовательность нуклеотидов. Активное использование рестриктаз для анализа ДНК началось в 70-х годах.

Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы (от лат. *Restrictio* – ограничение) – группа ферментов, относящихся к классу гидролаз. Они катализируют реакцию гидролиза фосфодиэфирных связей чужеродных ДНК в большинстве прокариотических и некоторых других организмах и выполняют тем самым «иммунную» функцию. Рестриктазы – являются частью сложной системы рестрикции-модификации, используемой бактериями для защиты резидентной ДНК от загрязнения последовательностями чужеродного происхождения. Эти энзимы узнают определенные последовательности в двухцепочечной ДНК. Выделяют их преимущественно из прокариотических клеток. Защита бактериального генома от собственной рестриктазы осуществляется метилированием нуклеотидных остатков аденина и цитозина [53,39].

Первые рестрикционные эндонуклеазы были выделены в 1968 г. из штаммов *E. Coli B* и *E. Coli K*. К настоящему времени уже выделено более четырех тысяч этих ферментов.

В отличие от экзонуклеаз, рестриктазы расщепляют нулеиновые кислоты не с конца молекулы, а в середине. При этом каждая рестриктаза узнает определенный участок ДНК длиной от четырех пар нуклеотидов и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне его.

Выделяют 3 основных класса ферментов рестрикции, сайты узнавания для которых могут быть симметричными или несимметричными.

- Рестриктазы первого класса, например, *EcoK* из *Escherichia coli K12*, узнают определенную последовательность нуклеотидов и разрезают двухцепочечную молекулу ДНК неподалеку от этой последовательности в произвольной точке, само место разреза не является строго специфичным.

- Рестриктазы второго класса, например, *EcoR I*, узнают определенную последовательность и расщепляют двойную спираль ДНК в определенной фиксированной точке внутри этой последовательности. Рестриктазы этого класса узнают в основном палиндромные последовательности.

- Рестриктазы третьего класса, например *EcoP I*, узнают нужную последовательность и разрезают двухцепочечную молекулу ДНК, отступив на определенное число нуклеотидных пар от ее конца (или в нескольких точках на разном удалении от сайта узнавания). При это образуются фрагменты ДНК с ровными (тупыми) концами или с выступающими (липкими) 5'- или 3'-концами. Эти рестриктазы узнают асимметричные сайты [50].

В подавляющем большинстве в биотехнологии используют рестриктазы 2-го типа. Энзимы системы рестрикции-модификации этого типа состоят из

двух отдельных белков: рестриктирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы. Они нуждаются в ионах Mg^{2+} в качестве кофакторов.

На данный момент выделено более 500 рестриктаз второго класса. Однако, среди энзимов, выделенных из различных микроорганизмов, встречаются такие, которые узнают на ДНК одни и те же последовательности. Такие пары называют изошизомерами.

Большинство рестриктаз второго класса специфически узнают на ДНК тетра- и гексануклеотидные последовательности. Поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупнощеплящие. Чем короче олигонуклеотидная последовательность сайта рестрикции, узнаваемого рестриктазой, тем чаще этот сайт встречается в случайной последовательности нуклеотидов, в которой каждый из четырех нуклеотидов представлен с одинаковой частотой. Так, случайная тетрануклеотидная последовательность встречается в среднем через каждые 256 п.о., а гексануклеотидная через каждые 4096 п.о.

Действующую в настоящее время номенклатуру названий рестриктаз предложили Смит и Натанс. Она основана на следующих правилах:

- Название рода и вида микроорганизма обозначается тремя латинскими буквами (например, *Escherichia coli* – Eco или *Bacillus stearothermophilus* - Bst);
- За родо-видовым названием следует обозначение штамма (EcoR, BstEN);
- Если штамм содержит несколько различных систем рестрикции-модификации, то они обозначаются разными римскими цифрами (Dra I, Dra III, BstEN I, BstEn II).

Основными характеристиками всех рестриктаз являются:

- узнаваемая последовательность нуклеотидов;
- место расщепления;
- зависимость активности от наличия метилированных оснований в пределах узнаваемой последовательности [36].

Ферменты рестрикции являются эффективным инструментом исследования. Они позволяют превращать молекулы ДНК больших размеров в набор фрагментов длиной от нескольких сотен до нескольких тысяч оснований. С помощью метода электрофореза в агарозном геле фрагменты ДНК, различающиеся по размеру, можно легко разделить, а затем исследовать каждый фрагмент отдельно.

Короткие фрагменты мигрируют намного быстрее, нежели длинные. При сравнительно высокой концентрации агарозы большие фрагменты не могут проникнуть в гель. В процессе миграции рестрикционные фрагменты не деградируют, их можно вымывать в виде биологически активных двуцепочечных молекул. При окрашивании гелей красителями, связывающимися с ДНК, выявляется набор полос, каждая из которых отвечает рестрикционному фрагменту, молекулярную массу которого можно определить, проведя калибровку с помощью ДНК с известными молекулярными массами (ДНК-маркерами). Для каждой рестриктазы

существуют оптимальные условия реакции (температура, состав буфера), которые приводятся в описании, прилагаемой фирмой-изготовителем [1,48,60].

ДНК-маркер – представляет собой смесь специальных плазмид гидролизованных определенными ферментами с образованием около десятка фрагментов пригодных для использования в качестве стандарта молекулярных масс при гель-электрофорезе.

Единица активности рестриктазы – это количество фермента, необходимое для гидролиза 1 мкг ДНК в реакционной смеси объемом 50 мкл при оптимальных температурных условиях (большой частью при 37°C) за 1 час.

Рестриктазы хранятся при -20°C в буфере с 50% глицерина. Ферменты, вынутые из морозильной камеры, следует держать только на льду и не дольше, чем это необходимо. Объем добавляемых рестриктаз не должен превышать 1/10 от объема реакционной смеси, иначе избыток глицерина ингибирует реакцию [61].

1.8.2 Звездчатая активность рестриктаз

При неоптимальных условиях реакции, некоторые ферменты рестрикции способны к расщеплению сайтов рестрикции, которые похожи, но не идентичны заявленной производителем последовательности. Такая измененная специфичность называется Star-активностью. Проявляется при определенных условиях проведения реакции:

- использование избытка рестриктаз;
- изменение рН и ионной силы инкубационной среды;
- замена ионов Mg^{2+} на некоторые другие ионы двухвалентных металлов;
- добавление органических растворителей (глицерин, диметилсульфоксид, этанол и др.).

При проведении электрофореза это приводит к появлению «шмера» (размазанная туманная полоска ДНК, идет от старта до финиша) вместо четких полос в геле или к появлению новых полос [13].

1.8.3 Применение рестриктаз

Рестриктазы, наряду с их значимостью для научных экспериментов, имеют огромное практическое значение, поскольку являются незаменимым инструментом молекулярных генетиков при выполнении диагностических исследований [57].

Благодаря своим свойствам, каждая рестриктаза узнает свой строго специфичный сайт. При использовании для рестрикции нескольких эндонуклеаз и последующего анализа электрофоретических картин гидролиза можно добиться полного упорядочивания расположения сайтов рестрикции друг относительно друга и создавать таким образом карты исследуемых участков ДНК. Такая информация в дальнейшем используется для выявления различного рода мутаций. Если в структуре любого из сайтов произойдет изменение (мутация) даже одного нуклеотида, то этот сайт не будет узнаваться

рестриктазой и расщепляться, вследствие чего картина гидролиза на электрофореze изменится. Помимо «исчезновения» сайта узнавания для определенных рестриктаз, в некоторых случаях вследствие мутации в гене может возникнуть дополнительный сайт, что позволяет легко идентифицировать такую мутацию при проведении гидролиза продукта ПЦР и последующего гель-электрофореза реакционной смеси [52].

1.9 Электрофорез

1.9.1 Принцип электрофореза

Электрофорез в гелях – это метод, который служит для разделения макромолекул на основе их электрического заряда, размера и других физических свойств. Термин электрофорез описывает миграцию заряженных частиц под воздействием электрического поля. Первая часть слова «электро» относится к электричеству, а вторая «форез» происходит от греческого *phoros*, что означает «переносить». Таким образом, электрофорез в гелях – это метод, в котором молекулы вынуждены перемещаться через пространство геля под воздействием электрического тока. Движущей силой электрофореза является напряжение, прикладываемое к электродам на каждом конце электрофорезной камеры. Свойства молекул определяют, насколько быстро электрическое поле может перемещать их через желеобразную среду.

Много важных биологических макромолекул (например, аминокислоты, пептиды, белки, нуклеиновые кислоты) обладают ионизируемыми группами, и при заданном рН существуют в растворе как электрически заряженные частицы, либо как катионы (+), либо как анионы (-). В зависимости от природы заряда среды, заряженные частицы будут мигрировать либо к катоду, либо к аноду. Например, когда электрическое поле прилагается к молекулам при нейтральном рН, отрицательно заряженные фосфатные группы ДНК (остаток фосфорной кислоты в 5' положении дезоксирибозы) способствуют ее перемещению в сторону анода [67].

Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом, используемым для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. Эта методика проста, быстро осуществляется, и способна разделять фрагменты ДНК, которые не могут быть разделены надлежащим образом с помощью других процедур. Более того, локализация ДНК в геле может быть определена путем окрашивания бромистым этидием (флуоресцентным интеркалирующим красителем) в низких концентрациях [31].

1.9.2 Электрофорез в агарозном геле

Гель-электрофорез – это метод, в основном используемый для разделения нуклеиновых кислот и белков. Разделение макромолекул зависит от двух переменных: заряда и массы. Когда биологический образец, такой как ДНК, наносится в лунки геля и подключается постоянное напряжение, две эти

переменные воздействуют на движение молекул одновременно. Молекулы ДНК начинают двигаться к положительно заряженному электроду (аноду). «Силы трения» материала, образующего гель, действуют как «молекулярное сито», разделяя молекулы по размеру. В процессе электрофореза макромолекулы вынуждены перемещаться через поры, и скорость их перемещения через электрическое поле зависит от следующих параметров:

- сила электрического поля;
- размер и форма молекул;
- относительная гидрофобность образцов;
- плотность геля;
- ионная сила и температура буфера, в котором движутся молекулы.

Поскольку поры в полиакриламидном геле для больших молекул ДНК слишком малы, то для разделения молекул ДНК по размеру были разработаны специальные гели на основе агарозы (полисахарид, получаемый из водорослей). Оба эти метода разделения ДНК широко используются для аналитических и препаративных целей [31,7].

1.9.2.1 Компоненты электрофореза в агарозном геле

Агароза. Агароза, природный коллоид, который выделяют из морских водорослей, является линейным полисахаридом (средняя молекулярная масса ~12000 Да), образованным повторяющимся элементом – агаробиозой, которая в свою очередь состоит из чередующихся элементов: галактозы и 3,6-ангидрогалактозы. Агароза очень хрупка, и легко разрушается при манипулировании. Агарозные гели имеют поры большого размера и используются преимущественно для разделения больших молекул с молекулярной массой больше, чем 200 кДа.

Разделение в агарозных гелях, происходит быстро, но с ограниченным разрешением, так как полосы, образующихся в агарозных гелях, имеют тенденцию размываться/диффундировать и расплываться в стороны. Это является результатом большого размера пор и не может быть предотвращено. Агарозные гели получают суспендированием сухого порошка агарозы в водном буфере, и кипячением смеси до того момента, когда агароза расплавится и образует прозрачный раствор. Затем раствор наливают на подложку (для образования формы) и дают остыть до комнатной температуры, чтобы сформировался прочный гель. При застывании агароза формирует матрикс, плотность которого определяется ее концентрацией.

Буферы для электрофореза. На электрофоретическую подвижность ДНК воздействуют состав и ионная сила буфера для электрофореза. В отсутствие ионов, электропроводность минимальна, и перемещение ДНК происходит медленно, если вообще происходит. В буфере с высокой ионной силой электропроводность очень эффективна (это хорошо), но образуется значительное количество тепла. В худшем случае, гель расплавляется и ДНК денатурирует.

Существует несколько буферов для электрофореза нативной двухцепочечной ДНК. Они содержат EDTA в концентрации приблизительно 2 mM и Tris-ацетат (TAE), Tris-борат (TBE) или Tris-фосфат (TPE), pH 7.8 – 8.3. Буферы для электрофореза обычно готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре. Буфер TBE первоначально использовали для электрофореза в агарозном геле при рабочей силе буфера 1x (однократный). 1-кратный TBE буфер содержит 89 mM Трис, 89 mM борную кислоту и 2 mM ЭДТА, pH 8.3. Однако оказалось, что рабочий раствор 0.5x обеспечивает более чем достаточную емкость буфера, и в настоящее время почти всегда электрофорез в агарозном геле проводят с использованием этой концентрации буфера.

Концентрация агарозы. Фрагмент ДНК заданного размера перемещается в геле на различные расстояния в зависимости от концентрации агарозы. При соответствующих концентрациях агарозы и/или буфера возможно разделить сегменты ДНК, содержащие от 20 до 500.000 н.п. (нуклеотидных пар). В горизонтальных гелях агароза обычно используется в концентрации от 0,7% до 3%.

Маркерная ДНК. При заданном напряжении, концентрации агарозного геля и буфера, расстояние перемещения зависит от молекулярной массы исходного материала. Поэтому, маркерная ДНК известного размера должна наноситься на дорожки и с левого, и с правого края геля. Маркер обычно содержит определенный набор сегментов известной массы ДНК, которые облегчают определение размера исследуемой ДНК, если какое либо систематическое искривление профиля электрофореза возникает во время проведения процесса.

Буфер для нанесения. Образцы ДНК, которые будут наноситься на агарозный гель, сначала смешивают с буфером для нанесения, обычно содержащим воду, глицерин и краситель (например, ксиленцианол, бромфеноловый синий, бромкрезол зеленый и др.). Максимальное количество ДНК, которое может быть нанесено, зависит от количества фрагментов. Минимальное количество ДНК, которое может выявлено на снимках геля, окрашенного бромистым этидием, составляет около 2 нг в полосе, шириной 0.5 см. Если в полосе такой ширины находится более 500 нг ДНК, значит, дорожка перегружена, что приводит к размыванию полосы. Буфер для нанесения используется для трех целей:

- увеличение плотности образца для обеспечения попадания ДНК на дно лунки;
- добавления красителя к образцу, чтобы облегчить процесс нанесения;
- добавление к образцу такого красителя, который в электрическом поле будет двигаться в сторону анода на предсказуемое расстояние [31, 49].

1.10 Анализ *In silico*

In silico – термин, обозначающий компьютерную симуляцию эксперимента, чаще биологического. Фраза была создана по аналогии с фразами *in vivo* (в живом организме) и *in vitro* (в пробирке), которые часто используются в биологии.

С помощью компьютерного моделирования анализируют нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности, производят выравнивание последовательностей, поиск гомологичных последовательностей ДНК, РНК и белков, построение филогенетических карт, используя специальное программное обеспечение. Осуществляют такие манипуляции как теоретические амплификация, 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, аминокислот, белков и работать с ними.

На данный момент имеется огромное количество генетических данных, находящихся в открытом доступе на специализированных порталах. Математическая, аналитическая и программная обработка данных последовательностей имеет явное преимущество перед экспериментальными исследованиями в области трудоемкости, стоимости и времени.

Применение биоинформационного подхода позволяет планировать и моделировать эксперименты для того что бы снизить вероятность ошибки в ходе практического эксперимента, а также снизить количество употребляемых ресурсов [8].

2 Материалы и методы

2.1 Объекты идентификации

Образцы биомассы бактерий были любезно предоставлены Ольгой Кондратенко, магистром кафедры биотехнологии из группы индийского исследователя Саеда Бакера

2.2 Выделение ДНК

Выделение бактериальной геномной ДНК проводили с использованием AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit производства компании Ахуген (производства КНР).

Выделение суммарной бактериальной ДНК с использованием этого набора основано на высвобождении геномной ДНК при помощи лизирующего буфера, Buffer G-A. После этого быстрое отделение геномной ДНК от белков, палисахаридов и липидов достигается за счет уникального этапа разделения фаз. Затем высокоочищенная суммарная ДНК из нижней фазы выборочно связывается с силикатной мембраной на специальной колонке Miniprep. После тщательной промывки буферами Buffer W1 и Buffer W2 для удаления остаточных примесей и соли очищенная бактериальная ДНК элюируется с колонки Miniprep TE-буфером или бидистиллятом. Этот набор предназначен для быстрого выделения до 20 мкг геномной ДНК из 1.0×10^9 бактериальных клеток. Очищенные фрагменты ДНК имеют размеры преимущественно ≥ 30 т.п.н. и подходят для различных процедур, требующих высокоочищенной ДНК с высокой молекулярной массой, таких как ПЦР, Саузерн-блот-анализ и другие.

Необходимое оборудование и реактивы.

Оборудование:

- микробиологический косяк / чаша Петри с культурой бактерий
- микробиологическая петля
- спиртовка
- спички
- штатив
- эппиндорфы
- автоматические пипетки
- наконечники
- встряхиватель типа Vortex
- центрифуга
- термостат

Реактивы:

- Раствор *RNase A*: для очистки ДНК от РНК. 50 мг/мл. Стабилен при комнатной температуре до 6 месяцев. Рекомендуемая температура -20°C для длительного хранения. Если имеется осадок, используйте небольшую аликвоту буфера S для растворения осадка, затем перенесите в емкость с буфером S.

- *Lysozyme*, лиофилизат: для разрушения клеточной стенки бактерий. Растворяют в стерильном 50% глицерине до конечной концентрации 50 мг/мл. Растворенный лизоцим стабилен в течение 6 месяцев при -20°C.

- *Buffer S*: буфер для приготовления бактериальных протопластов. После добавления RNase A хорошо перемешать и хранить при 4°C. Растворенная RNКаза A стабильна в течение 6 месяцев при хранении буфера S при 4°C.

- *Раствор 0.25 M EDTA*: хранить при комнатной температуре.

- *Buffer G-A*: буфер для лизиса. Хранить при комнатной температуре.

- *Buffer G-B*: буфер-депротеинизатор, для удаления белка. Хранить при комнатной температуре.

- *Buffer DV-A*: Используется для приготовления буфера DV. Хранить при комнатной температуре.

- *Buffer DV*: буфер для фазового разделения. Хранить при комнатной температуре.

- *Buffer BV*: буфер для связывания ДНК. Хранить при комнатной температуре.

- *Buffer W1*: отмывочный буфер. Хранить при комнатной температуре.

- *Buffer W2*: концентрат для приготовления раствора для обессоливания. Перед использованием набора добавить этанол в соответствии с инструкциями на этикетке флакона. Можно использовать 100% или 95% этанол. Хранить при комнатной температуре.

- *Eluent*: буфер для элюирования. Хранить при комнатной температуре.

Подготовка перед экспериментом

1) Перед использованием набора необходимо добавить к концентрату Buffer W2 количество этанола, указанное на этикетке емкости. Можно использовать 100% или 95% денатурированный этанол.

2) Приготовьте Buffer DV: добавьте 2 мл Buffer DV-A, 125 мл изопропанола и 75 мл изобутанола в 250-миллилитровую емкость, входящую в комплект, и хорошо перемешайте.

3) Охладите буфер DV до 4°C перед экспериментом.

4) Заранее растворите лизоцим в 50% глицерине.

5) Добавьте раствор RNase A в Buffer S и хорошо перемешайте.

Если присутствует осадок, используйте небольшой объем Buffer S для ресуспендирования осадка в растворе RNase A и затем перенесите все содержимое в емкость с Buffer S.

6) Включите термостат и установите температуру 65°C.

7) Перед каждым использованием проверяйте Buffer G-A и Buffer GB на наличие осадка. Если осадок имеется, то нагрейте буфер до 65°C, а затем охладите до комнатной температуры перед использованием.

8) Предварительно, рекомендуется нагреть Eluent до 65°C (нагревание улучшает эффективность элюирования).

Методика выделения:

1. Соберите биомассу бактерий (около 100 мг) в 2 мл пробирку для микроцентрифугирования. Пропипетируйте в физрастворе и отмойте центрифугированием на максимальной скорости (12000 оборотов) в течение 30 секунд. Удалите супернатант и ресуспендируйте бактериальный осадок в 150 мкл Buffer S, содержащего RNase A.

2. Добавьте 20 мкл раствора Lysozyme и хорошо перемешайте. Инкубируйте при комнатной температуре 5 минут.

Если работаете с грам-положительными бактериями, инкубируйте при 37°C в течение 30 минут после добавления Lysozyme.

3. Добавьте в получившийся раствор 30 мкл 0,25 М ЭДТА (рН 8,0). Хорошо перемешайте и инкубируйте на льду 5 минут.

4. Добавьте 450 мкл раствора Buffer G-A и перемешайте на вортексе в течение 15 секунд. Поместите пробирку в нагретый до 65°C термостат на 10 минут.

5. Добавьте 400 мкл раствора Buffer G-B, а затем 1 мл раствора Buffer DV (предварительно охлажденного до 4°C). Хорошо перемешайте. Центрифугируйте при 12000 оборотах/мин в течение 2 минут.

6. Удалите большую часть окрашенной верхней фазы, не нарушая межфазную поверхность.

7. Добавьте 1 мл раствора Buffer DV (предварительно охлажденного до 4°C) к оставшейся межфазе и нижней фазе. Перемешайте до однородности и центрифугируйте при 12000 оборотах/мин в течение 2 минут.

8. Отбросьте окрашенную верхнюю фазу. Перенесите микропипеткой нижнюю фазу на спин-фильтр, помещенный в 2 мл пробирку для микроцентрифугирования, и центрифугируйте при 12000 оборотах/мин в течение 1 минуты.

9. Удалите спин-фильтр из 2 мл пробирки с фильтратом. Добавьте к фильтрату 400 мкл раствора Buffer BV и хорошо перемешайте.

10. Поместите колонку Miniprep в 2 мл пробирку для микроцентрифугирования. Перенесите смесь из пробирки шага 9 на колонку Miniprep. Центрифугируйте при 12000 оборотах/мин в течение 1 минуты.

11. Удалите фильтрат из 2 мл пробирки для микроцентрифугирования. Поместите колонку Miniprep обратно в 2 мл пробирку для микроцентрифугирования. Добавьте 500 мкл раствора Buffer W1 в колонку Miniprep и центрифугируйте при 12000 оборотах/мин в течение 1 минуты.

12. Удалите фильтрат и поместите колонку Miniprep обратно в 2 мл пробирку для микроцентрифугирования. Добавьте 700 мкл раствора Buffer W2 и центрифугируйте при 12000 оборотах/мин в течение 1 минуты. Повторите этот этап промывки со второй аликвотой 700 мкл раствора Buffer W2.

13. Удалите фильтрат. Поместите колонку Miniprep обратно в 2 мл пробирку для микроцентрифугирования. Центрифугируйте при 12000 оборотах/мин в течение 1 минуты.

14. Перенесите колонку Miniprep в чистую пробирку для микроцентрифугирования объемом 1,5 мл. Чтобы элюировать ДНК, добавьте 100-200 мкл бидистиллята или раствор Eluent в центр мембраны. Дайте постоять 1 минуту при комнатной температуре. Центрифугируйте при 12000 оборотах/мин в течение 1 минуты [64].

Для определения качества выделенной ДНК используем спектрофотометр и электрофорез

2.3 Методика проведения электрофореза

Оборудование и реактивы необходимые для проведения электрофореза

Оборудование:

- штатив
- автоматические пипетки
- наконечники
- встряхиватель типа Vortex
- центрифуга
- термостойкий цилиндр для приготовления агарозы
- мерный цилиндр
- фильтр
- шпатель
- подложка
- СВЧ печь
- ванночка для горизонтального электрофореза
- гребенка
- источник питания Bio-Rad PowerPac HV (1-400 Вт, 0,01-500мА, 20-5000В).
- камера для горизонтального электрофореза (гель 7×10) Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad.
- гель-документирующая система Bio-Rad Gel Doc XR с компьютером.

Реактивы:

- Порошок агарозы
- Бромистый этидий: интеркалирующий краситель, для визуализации ДНК в УФ свете.
- Буферы для электрофореза (трис-ацетатные, трис-боратные, трис-фосфатные)
- Днк-маркер
- 6-тикратный буфер для нанесения (ксиленцианол FF, метиленовый синий, глицерин и вода).

Ход работы:

Перед смешиванием буфера для нанесения и ДНК, пробы необходимо перемешать на вортексе, а затем отцентрифугировать.

1. Взвесить агарозу и добавить ее к соответствующему количеству 0.5×TBE буфера.

2. Поместить в микроволновую печь на 45-50 секунд при максимальном режиме, до получения однородной суспензии, затем остудить до 60°C.
3. Установить гребенку в форму для агарозы (форму выровнять по уровню для равномерного нанесения раствора).
4. Залить остуженный раствор агарозы в форму для образования твердого геля. Оставить раствор в форме на 25 минут для застывания.
5. Удалить гребенку и поместить гель в электрофоретическую кювету.
6. Залить гель слоем электрофоретического буфера (гель должен быть покрыт буфером, чтобы не происходило подсыхания геля).
7. Смешать пробы ДНК с буфером для нанесения, содержащим глицерин и красители, в соотношении 5:1. Внести получившуюся смесь в лунки геля под электрофоретическим буфером с помощью автоматического дозатора. Ввести маркер (в первую и последнюю лунки).
8. Подсоединить электроды, установить напряжение и время, запустить электрофорез. Сверху на камеру положить охлажденный хладогент.
9. После окончания электрофореза достать гель, поместить его в раствор бромистого этидия для окрашивания и поставить на вортекс, на 25 минут.
10. Промыть гель дистиллированной водой.
11. Окрашенный гель поместить в трансиллюминатор.
12. Рассмотреть гель в ультрафиолетовом свете и задокументировать.

2.4 Методика проведения ПЦР

Необходимые оборудование и реактивы

Оборудование:

- штатив
- пробирки эппендорф
- автоматические пипетки
- наконечники
- встряхиватель типа Vortex
- центрифуга

Реактивы:

- ДНК-матрица: матрица для синтеза дочерних цепей.
- Taq-полимераза: термостабильный фермент, обеспечивающий рост, второй, комплементарной цепи.
- dNTPs (дезоксинуклеозидтрифосфаты): строительные блоки, используемые Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.
- Праймеры, прямой и обратный размерами от 15 до 30 пар нуклеотидов, играют ключевую роль в запуске реакции амплификации.
- Ионы Mg^{2+} : являются кофакторами для ДНК-полимеразы.
- ПЦР-буфер: смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальные условия для реакции, а так же стабильное значение pH.

-Дистиллированная H_2O : основа для протекания реакции, доведение объема реакционной смеси до необходимого.

Реакция ПЦР проводится в амплификаторе. Предварительно включаем амплификатор, что бы он прогрелся. Перед использованием реактивов их необходимо разморозить, перемешать на вортексе, а затем отцентрифугировать.

Примерный состав реакционной смеси в простейшем случае:

На одну пробу объемом 50 мкл требуется:

- 32 мкл дистиллированной H_2O
- 5 мкл 10 \times буфера
- 5 мкл dNTPs (с концентрацией по 0.5мМ каждого)
- 3 мкл $MgCl_2$ (с концентрацией 50мМ)
- 1 мкл прямого праймера + 1 мкл обратного праймеров с концентрациями по 1 μ М.
- 1 мкл Hot Start Polymeras (Taq-полимераза).

Все эти компоненты смешиваем в 1 пробирке объемом 1,5 мл из расчета на 32 пробы, затем в каждую добавляем по 48 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемых образцов ДНК.

Примерная программа для проведения ПЦР с Hot Start полимеразой:

- 95 $^{\circ}$ C – 5:00 мин
- 95 $^{\circ}$ C – 0:15 сек
- 56 $^{\circ}$ C – 0:20 сек
- 72 $^{\circ}$ C – 1:36 сек
- Go to 2:35 times
- 72 $^{\circ}$ C for 7:00 мин
- 4 $^{\circ}$ C – 18:00:00 или forever.

Для визуализации результатов амплификации используем электрофорез.

2.5 Проведение реакции рестрикции

Необходимое оборудование и реактивы.

Оборудование:

- штатив
- пробирки эппиндорф
- автоматические пипетки
- наконечники
- встряхиватель типа Vortex
- центрифуга
- термомиксер

Реактивы:

- 10 \times буфер (для каждой рестриктазы свой)
- BSA (бычий сывороточный альбумин): используется для стабилизации фермента. Предотвращает адгезию фермента к стенкам сосуда.
- дистиллированная H_2O
- исследуемые образцы ДНК

- фермент

Перед проведением реакции пробы необходимо разморозить, перемешать и отцентрифугировать.

Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК можно проводить в течение 2 ч. В приборе Thermomixer comfort производства фирмы Eppendorf. Реакция проходит при определенной температуре (которая конкретна для используемого фермента). Оптимальная температура указывается на упаковке фермента. Можно проводить 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1 ед. акт. рестриктазы.

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

- 5 мкл 10×буфера
- 10 мкл BSA(концентрации 0,5 мг/мл)
- 24 мкл дистиллированной H₂O
- 10 мкл ДНК (концентрация примерно 40 мкг/мл)
- 1 мкл фермента (активность 50000 е.а./мл)

Для визуализации результатов рестрикции используем электрофорез в агарозном геле.

3 Результаты

3.1 Проведение анализа *in silico*

[изъято 2 страницы]

3.2 Выделение ДНК из биомассы бактерий

[изъята 1 страница]

3.3 Получение ампликонов гена 16S рРНК

[изъята 1 страница]

3.4 Проведение реакций рестрикции

[изъято 2 страницы]

3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных

[изъято 11 страниц]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Был проведен *in silico* рестрикционный анализ амплифицированной рибосомальной ДНК ампликонов 500F-1350R и 8F-1492R гена 16S-pРНК бактерий родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Agrobacterim*, *Pantoea*, *Microbacterium*, *Exiguobacterium*, *Arthrobacter* с использованием данных GenBank для рестриктаз Sse9 I, Hae III, Rsa I, Msp I, Fat I, Tag I, Tru9 I, BstHI I и построены теоретические электрофореграммы.

Из образцов бактерий была выделена ДНК хорошего качества. Были получены ампликоны 500F-1350R и 8F-1492R гена 16S-pРНК исследуемых бактерий и проанализированы методом анализа амплифицированной рибосомальной ДНК.

На основании сравнительного анализа теоретических и экспериментальных данных, мы пришли к выводу что: образцы 1 и 9 это *Klebsiella pneumonia*, образцы 2 и 14 это *Escherichia coli*, образцы 3 и 28 *Bacillus cereus*, образцы 5 и 12 это *Bacillus pumilus*, образцы 6, 4, 18 это *Bacillus amyloliquefaciens*, образцы 7 и 13 это *Bacillus thuringiensis*, образцы 17 и 22 это *Pseudomonas fluorescens*, образец 19 это *Agrobacterium timefaciens*, образец 10 это *Bacillus methylotrophicus*, образцы 11 и 29 это *Pantoea agglomerans*, образцы 23, 24, 32 это *Microbacterium phyllosphaerae*, образцы 21, 27, 31 это *Exiguobacterium aurantiacum*, образцы 15 и 25 это *Arthrobacter aurescens*, образец 20 это *Bacillus atrophaeus*, образцы 16 и 26 *Arthrobacter globiformis*, образцы 8 и 30 это *Pseudomonas stutzeri*.

Было установлено, что использование рестриктазы BstHI I, так же как и Tag I позволяет идентифицировать *Klebsiella pneumonia* и *Escherichia coli*, при условии использования ампликонов около 900 п.о. Однако, различить бактерии рода *Bacillus* сложнее. При использовании ампликонов большего размера около 1500 п.о. для идентификации *Bacillus* наиболее подходящей является рестриктаза Tru9 I, которая позволяет различить 4 вида. Использование рестриктазы Fat I позволяет выявить еще *Bacillus methylotrophicus*. Рестриктазы Hae III и Msp I позволяют идентифицировать бактерии рода *Arthrobacter*. Рестриктаза Tag I хорошо подходит для идентификации бактерий родов *Pantoea*, *Microbacterium*, *Exiguobacterium* и *Pseudomonas*.

Метод рестрикционного анализа ампликонов гена 16S pРНК, в совокупности с традиционными методами, может служить удобным способом идентификации микроорганизмов при условии подходящего подбора эндонуклеаз рестрикции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
НК – нуклеиновые кислоты
OK – отрицательный контроль
ПКО – положительный контрольный образец
ПЦР – полимеразная цепная реакция
п.о. - пары оснований
РНК – рибонуклеиновая кислота
рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота
тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота
РС – реакционная смесь
bp – base pairs
ddNTPs - дидезоксинуклеозидтрифосфаты
dNTPs – дезоксинуклеозидтрифосфаты
dATP – дезоксиаденозинтрифосфат
dTTP – дезокситимидинтрифосфат
dGTP – дезоксигуанозинтрифосфат
dCTP – дезоксицитидинтрифосфат
EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid (Этилендиаминтетрауксусная кислота)
kb – kilo bass
MS – масс-спектрометрия
NGS - секвенирование следующего поколения
SNP – single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)
SGS - секвенирование второго поколения
TGS - секвенирование третьего поколения
ТАЕ – трис ацетат ЭДТА
ТВЕ – трис борат ЭДТА
ТРЕ – трис фосфат ЭДТА

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абдурашитов, М. А. Метод рестрикционного анализа геномов млекопитающих *in silico* / М. А. Абдурашитов [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчиннико : Москва, 2006. – Т.2, № 3. – С. 29 – 39.
2. Алексеева, А. Е. Возможности и перспективы применения методов массивного параллельного секвенирования в диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями / А. Е. Алексеева, Н. Ф. Брусигина // Медиаль. – 2014.- Т.12, №2. – С.6-28.
3. Бородинов, А. Г. Поколения методов секвенирования ДНК / А. Г. Бородинов [и др] // Научное приборостроение. – 2020. – Т.30, №4. – С.3-20.
4. Выделение ДНК [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://www.bioprotech.com.tw/databank/DataSheet/DNARNAPuri/axuprep%20bacterial%20genogen%20DNA%20miniprep%20kit.pdf>
5. Габидуллин, З. Г. Условно-патогенные грамотрицательные и грамположительные бактерии: учеб. пособие / З. Г. Габидуллин [и др.]. – Уфа: ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, 2014.- 82с.
6. Глушанова, Н. А. Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов / Н. А. Глушанова, А. И. Блинов, Н. Б. Алексеева // Медицина в Кузбассе. – 2015. -№35. - С. 36-41.
7. Гусейнов, О. А. Методы биохимических исследований : учеб. метод. пособие к лаб. занятиям / О. А. Гусейнов. - Красноярск: Сиб. федерал. университет, 2012. - 46 с.
8. Деринг, Т. В. Подбор рестриктаз для определения видов бактерий методом анализа ПДРФ / Т. В. Деринг. – Красноярск: Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, 2019. – 64 с.
9. Диткина, Е. Ю. Методы диагностики полиморфизма генов метаболизма липидов человека / Е. Ю. Диткина [и др] // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института. – 2012. - № 15. – С. 68-74.
10. Егорова О. Н. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции : федеральные клинические рекомендации / О. Н. Егорова [и др.]. – Москва, 2014. – 82 с.
11. Егорова, О. Н. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции: федеральные клинические рекомендации / О. Н. Егорова, Е. Б. Брусина, Е. В. Григорьев. – Москва, 2014. – 82с.
12. Железняк, Н. В. Медицинская микробиология : учеб. пособие / Н. В. Железняк, Г. А. Кардович, Н. М. Данющенко, И. И. Генералов. – Витебск : Витебский государственный медицинский университет, 2011. – 584с.
13. Звездчатая активность [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/star-activity>.

14. Зверев, В. В. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учеб. пособие / В. В. Зверев [и др.]. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2016. – 816 с.
15. Зорина, В.В. Основы Полимеразной Цепной Реакции : методическое пособие / В.В. Зорина. – Москва: ООО «ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ». – 2015. – 151с.
16. Кирилюк, А. А. Применение методов масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) в современной клинической лаборатории – обзор приложений, преимущества использования, современные подходы и возможности автоматизации / А. А. Кирилюк // Клини. лаб. диагностика. – 2014. - №9. – С.92-93.
17. Кисленко, В. Н. Ветеринарная микробиология и иммунология : учебник / В. Н. Кисленко, Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 752 с.
18. Козлова, Н. С. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном стационаре / Н. С. Козлова, Н. Е. Баранцевич, Е. П. Баранцевич // Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т.8, №1. – С. 79-84.
19. Лазарева, А. В. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология / А. В. Лазарева [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т.17, №3. – С. 170-186.
20. Литусов, Н. В. Грамположительные аэробные кокки : учеб. пособие / Н. В. Литусов. – Екатеринбург: УГМУ, 2016. – 89 с.
21. Литусов, Н. В. Общая микробиология : учеб. пособие / Н. В. Литусов. – Екатеринбург: УГМУ, 2015 – 516 с.
22. Литусов, Н. В. Род *Bacteroides* : учеб. пособие / Н. В. Литусов. – Екатеринбург: ФГБОУ ВО УГМУ, 2017. - 17 с.
23. Литусов, Н. В. Эшерихии : учеб. пособие / Н. В. Литусов. – Екатеринбург: УГМА, 2016. - 36 с.
24. Моисеева, Н. В. Роль бактерий рода *Enterobacter spp.* этиологии острых кишечных заболеваний у сельскохозяйственных животных / Н. В. Моисеева, Э. А. Якимова // Биотика. – 2015. – Т.6, №7. – С. 1-14.
25. Оганян, К. А. Энтерококки и их роль в перинатальной патологии / К. А. Оганян, О. Н. Аржанова, С. Л. Зациорская, А. М. Савичева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2015. - Т.64, №5. – С. 48-54.
26. Поздеев О. К. Медицинская микробиология : учеб. пособие / О. К. Поздеев. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 768 с.
27. Попов, Д. А. Послеоперационные инфекционные осложнения в кардиохирургии / Д. А. Попов // в 3-е издание. Лекции по сердечно-сосудистой хирургии: учеб. пособие / ред. Бокерия Л. А. – Москва, 2013. – С.
28. Припутневич, Т. В. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики

- септических состояний / Т. В. Припутневич [и др] // Клин. микробиол. и антимикр. химиотерапия. – 2014. - №1. – С.4-9.
29. Решедько, Г. К. *Escherichia coli* как возбудитель нозокомиальных инфекций в ОРИТ / Г. К. Решедько, А. Г Щебников, М. В. Морозов, Л. А. Решедько // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т.13, №4. – С. 314-321.
30. Слизень, В. В. Молекулярная биология бактерий : учеб.-метод. пособие / В. В. Слизень, Л. П. Титов. – Минск: БГМУ, 2007 – 48 с.
31. Сомма, М. Электрофорез в агарозном геле / М. Сомма, М. Кверчи // Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов. – 2013. – С. 1-13.
32. Фадеева, Т. В. *Bacteroides fragilis* в развитии абдоминальной хирургической инфекции / Т. В. Фадеева, Н. Н. Дремина, И. А. Шурыгина, Е. Е. Чепурных // Сибирский медицинский журнал. – 2018. - №3. – С.5-11.
33. Фесенко, О. В. Пневмонии, вызванные *Klebsiella pneumoniae* (фридлендеровские пневмонии) / О. В. Фесенко, С. Н. Швайко // Практическая пульмонология. – 2019. - №1. – С. 23-31.
34. Челпан, Л. Л. стрептококковая инфекция: вопросы патогенеза, роль в формировании соматической патологии у детей / Л. Л. Челпан, Е. В. Прохоров // Актуальная инфектология. – 2014. – Т.3, №2. – С.82-85.
35. Шепелин, А. П. Выявление стафилококков при использовании современных импортозамещающих питательных сред / А. П. Шепелин, А. Б. Сергеева, О. В. Полосенко // Бактериология. – 2018, Т.3, №2. – С. 64-71.
36. Янулайтис, А. А. Ферменты рестрикции и их применение / А. А. Янулайтис. - Люберцы: ВИНТИ, 1989. - 202 с.
37. Belak, S. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects / S. Belak // Vaccine. – 2007. – V.30, №25. – P. 5444-5452.
38. Boni, M. S. Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing American Tegumentary Leishmaniasis / M. S. Boni, L. K. Oyafuso, R. C. Soler, J.L. Lindoso // Rev Inst Med Trop Sao Paulo. – 2017. - №59.– P. 1-13.
39. Bower, E. K. A model for the evolution of prokaryotic DNA restriction-modification systems based upon the structural malleability of Type I restriction-modification enzymes / E. K. Bower [et al] // Nucleic Acid Res. – 2018. – V.46, №17. –P. 9067-9080.
40. Buszewski, B. Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques / B. Buszewski [et al.] // J. AOAC Int. – 2017. - №100. – P.1607–1623.
41. Cihan , A. The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16s rRNA gene sequences and ardra analyses isolated from geothermal regions of turkey / A. Cihan [et.al] // Brazilian Journal of Microbiology. – 2012. – V. 43, №1. – P. 309-324.

42. Durazzi, F. Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota / F. Durazzi [et al] // *Nature communications*. – 2021. – № 3030. – P. 1-10.
43. Franco-Duarte, R. *Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present* / R. Franco-Duarte [et al] // *Microorganisms*. - 2019. - №130. - P.1-32.
44. Franco-Duarte, R. *Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present* / R. Franco-Duarte [et al.] // *Microorganisms*. - 2019. - №130. - P.1-32.
45. Gwak, H. J. Data-Driven Modeling for Species-Level Taxonomic Assignment From 16S rRNA: Application to Human Microbiomes / H. J. Gwak, M. Rho // *Front Microbiol*. – 2020. – V. 11, №12. – P. 1-48.
46. Jethro, S. J. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis / S. J. Jethro [et al] // *Nature Communications*. – 2019. - №5029. - V.10, P. 1-11.
47. Juste, A. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes / A. Juste, B. Thomma, B. Lievens // *Food Microbiol*. – 2008. - №25. - P. 745–761.
48. Kisiala, M. Restriction endonucleases that cleave RNA/DNA heteroduplexes bind dsDNA in A-like conformation / M. Kisiala [et al] // *Nucleic Acid Res*. – 2020. – V.48, №12. – P.6954-6969.
49. Motohashi, K. Development of highly sensitive and low-cost DNA agarose gel electrophoresis detection systems, and evaluation of non-mutagenic and loading dye-type DNA-staining reagents / K. Motohashi // *PLoS One*. – 2019. – V.14, №9. – P. 1-59.
50. Oiler, A. Ability of DNA and spermidine to effect the activity of restriction endonucleases from several bacterial species / A. Oiler [et al] // *Biochemistry*. - 1991, V.30.- P.543-549.
51. Palmer, M. P. Polymerase Chain Reaction–Electrospray–Time-of-Flight Mass Spectrometry Versus Culture for Bacterial Detection in Septic Arthritis and Osteoarthritis / M. P. Palmer [et. al] // *Genet Test Mol Biomarkers*. – 2016. – V. 20, № 12. – P. 721-731.
52. Pingoud, A. Type II restriction endonucleases – a historical perspective and more / A. Pingoud, G. G. Wilson, W. Wende // *Nucleic Acid Res*. – 2017. – V.44, №16. – P. 7489-7527.
53. Pingoud, A. Type II restriction endonucleases : structure and mechanism / A. Pingoud [et al] // *Cellular and molecular life sciences*. – 2005. – T. 62, №6. – P. 685-707.
54. Ramya, S. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens / S. Ramya [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – V.2, №10. – P. 1-22.
55. Rasmussen, H. B. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis–valuable tool for

- genotyping and genetic fingerprinting / H. B. Rasmussen. - InTech, 2012. – C. 315-334.
56. Redondo-Salvo, S. Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids / S. Redondo-Salvo [et al] // Nature communications. – 2020. – V. 11, №3602. – P. 1-13.
 57. Robinson, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications / P. K. Robinson // Essays Biochem. – 2015. – V.15, №59. – P.1-41.
 58. Sanger, F. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA / F. Sanger [et al] // Nature . – 1977. – V.256, №5596. – P.687-695.
 59. Schumm, J. W. Identification of mor than500 RFLPs by screening random genomic clones / J. W. Schumm [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 1988. - №42. – P. 143-159.
 60. Shen, B. W. Structure, subunit organization and behavior of the asymmetric Type IIT restriction endonuclease BbvCI / B. W. Shen [et al] // Nucleic Acid Res. –2019. - V.47, №1. – P.450-467.
 61. SibEnzyme [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://russia.sibenzyme.com/products/restrictases>
 62. Slatko, B. E. DNA sequencing by the dideoxy method / B. E. Slatko [et al] // Curr Protoc Mol Biol. – 1999. – V.47, №1. – P. 1-39.
 63. Wallis, Y. Automaed DNA sequencing / Y. Wallis, N. Morell // Methods Mol. Biol. – 2011. – V.688. – P.173-185.
 64. Wang, T. The persistence potential of transferable plasmids / T. Wang, L. You // Nature communications. – 2020. – V. 11, №5589. – P. 1-10.
 65. Wang, Y. Endonuclease Restriction-Mediated Real-Time Polymerase Chain Reaction: A Novel Technique for Rapid, Sensitive and Quantitative Detection of Nucleic-Acid Sequence / Y. Wang [et.al] // Front Microbiol. – 2016. – V7. – P.1-13.
 66. Watts, G. S. 16S rRNA gene sequencing on a benchtop sequencer: accuracy for identification of clinically important bacteria / G. S. Watts [et al.] // J Appl Microbiol. – 2017. – V.6, №136. - P. 1584–1596.
 67. Westermeier, R. Electrophoresis in Practice: A Guide to methods and applications of DNA and protein separations / R. Westermeier. – Germany: WILEY-VCH, 2016. – V.5. – 435с.
 68. William, P. H. Not So Simple After All: Bacteria, Their Population Genetics, and Recombination / P. H. William // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2016. – V.7, №8. – P. 1-18.
 69. Zhong, Y. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine / Y. Zhong [et al] // Ann Lab Med. – 2021. – V. 41, №1. – P. 25-43.
 70. Ziesemer, K. A. Correction: Corrigendum: Intrinsic challenges in ancient microbiome reconstruction using 16S rRNA gene amplification / K. A. Ziesemer [et al] // Nature communications. – 2016. – № 27163. – P. 1-2.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е. И. Шишацкая

« 24 » июня 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Применение метода рестрикционного анализа гена рРНК для идентификации
возможных возбудителей заболеваний

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

Т. В. Деринг

инициалы, фамилия

Рецензент



подпись, дата

профессор, д.б.н

должность, ученая степень

О. П. Дубовская

инициалы, фамилия

Красноярск 2021