

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Шишацкая Е. И.

«___» _____ 2021г

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01. - Биология

Изучение сапрофитной флоры как компонента микробиома человека

Руководитель _____ к.б.н., доцент О.А. Гусейнов

Студент ББ17-32Б, №041723663 _____ К.А. Драндрова

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Изучение сапрофитной флоры как компонента микробиома человека» содержит 51 страницу текстового документа, 6 таблиц, 10 иллюстраций, 84 литературных источника.

Ключевые слова: микробиом, кишечная микрофлора, 16S рРНК, полимеразная цепная реакция, электрофорез, ПДРФ, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

Цель работы: идентифицировать образцы бактерий при помощи метода, основанного на генетических особенностях этих бактерий.

Задачи:

1. Выделить ДНК из опытных образцов бактерий и определить концентрацию и чистоту полученных препаратов ДНК.
2. С помощью метода ПЦР получить ампликоны гена 16SpРНК с использованием выделенных образцов ДНК.
3. Провести реакцию рестрикции полученных ампликонов.
4. Провести электрофорез рестрикетов и проанализировать электрофореграммы.
5. Сравнить практические электрофореграммы с теоретическими из нашей базы данных.
6. Сделать выводы о видовой принадлежности бактерий.

При учёте влияния бактерий при терапии, важна их точная идентификация. Вместе с традиционными методами идентификации микроорганизмов с использованием культуральных и морфологических характеристик, химических и биохимических реакций, в последнее время все более широкое применение находят методы определения микроорганизмов, основанные на сравнении нуклеотидных последовательностей генов микроорганизмов и анализе полиморфизма фрагментов ДНК, которые были получены амплификацией отдельных генов бактерий. Метод анализа

полиморфизма длин рестрикционных фрагментов позволил нам идентифицировать 11 образцов бактерий. Этот метод в дополнение к классическим, может служить достаточно простым, скорым и дешевым способом идентификации микроорганизмов.

Оглавление

РЕФЕРАТ	2
Оглавление	4
Введение.....	6
1 Обзор литературы	8
1.1 Бактерии в организме человека	8
1.1.1 Кожа	8
1.1.2 Слизистая оболочка глаз	8
1.1.3 ЖКТ	9
1.1.4 Влагалище.....	9
1.1.5 Ротовая полость.....	10
1.1.6 Легкие.....	10
1.2 Заболевания, связанные с нарушением микробиома	11
1.2.1 Воспалительное заболевание кишечника (ВЗК).....	12
1.2.2 Стойкий колит, вызванный антибиотиками	13
1.2.3 Атопическая астма	13
1.2.4 Ожирение и сахарный диабет 2 типа (СД2).....	14
1.2.5 Сердечно-сосудистые заболевания	15
1.2.6 Ревматоидный артрит	15
1.3 Микробиом, как терапевтическая мишень	16
1.3.1 Трансплантация фекальной микробиоты	16
1.4 Генетическая система бактерий	17
1.5 Ген 16S rRNA	18
1.6 ПЦР	19
1.7 ПДРФ.....	21
1.8 Электрофорез в геле.....	21
1 Материалы и методы	23
2.1 Объект исследования	23
2.2 Методика выделения ДНК	23
2.3 Методика проведения ПЦР	25
2.4 Методика очистки ампликонов	27
2.5 Методика проведения реакции рестрикции	27

2.6 Гель электрофорез.....	27
3 Результаты.....	30
3.1 Выделение ДНК из образцов бактерий	30
3.2 Получение ампликонов гена 16S-рРНК.....	31
3.3 Проведение рестрикции ампликонов 500L – 1350R	33
3.4 Проведения анализа <i>in silico</i>	34
3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных	35
Заключение	39
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	40
Список используемых источников.....	41

Введение

Взрослый человек колонизируется многими сотнями видов бактерий, а общая микробная биомасса у среднестатистического взрослого человека составляет приблизительно 3–4 килограмма [1]. Бактерии и другие микроорганизмы в организме составляют микробиоту человека. Большинство находится в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), но также и все поверхности, контактирующие с окружающей средой, колонизированы. Симбиотические бактерии в нашем организме облегчают переваривание пищи, делают питательные вещества более биодоступными, нейтрализуют токсины [2, 3, 4]. Кроме того, микробиота играет важную роль в защите от инфекций, защищая колонизированные поверхности от вторжения патогенов. В последние годы наблюдается рост исследований микробов в организме и их геномов (ДНК). Становится все более очевидным, что микробы важны для здоровья человека, но также они могут являться возбудителями болезней. Воспалительные заболевания кишечника, язвы желудка, рак толстой кишки и ожирение являются примерами заболеваний, в которых микробиота играет важную роль [4, 5]. С накоплением знаний о влиянии бактерий на здоровье человека, появляются новые методы, которые основаны на применении пробиотиков в терапии.

Актуальность работы

При учёте влияния бактерий в терапии, важна их точная идентификация. Вместе с традиционными методами идентификации микроорганизмов с использованием культуральных и морфологических характеристик, химических и биохимических реакций [6], в последнее время все более широкое применение находят методы определения микроорганизмов, основанные на сравнении нуклеотидных последовательностей генов микроорганизмов [7] и анализе полиморфизма фрагментов ДНК, которые были получены амплификацией отдельных генов бактерий [8].

Цель

Идентифицировать образцы почвенных бактерий при помощи метода, основанного на генетических особенностях этих бактерий.

Задачи

Для достижения заданной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить ДНК из опытных образцов бактерий и определить концентрацию и чистоту полученных препаратов ДНК.
2. С помощью метода ПЦР получить ампликоны гена 16SpРНК с использованием выделенных образцов ДНК.
3. Провести реакцию рестрикции полученных ампликонов.
4. Провести электрофорез рестрикетов и проанализировать электрофореграммы.
5. Сравнить практические электрофореограммы с теоретическими из нашей базы данных.
6. Сделать выводы о видовой принадлежности бактерий.

Работа выполнена в Центре коллективного пользования Института Фундаментальной Биологии и Биотехнологии СФУ.

1 Обзор литературы

1.1 Бактерии в организме человека

Бактерии и другие микроорганизмы обитают на коже и в слизистых оболочках различных органах человека. Их роль заключается в создании нормальной, физиологически здоровой микрофлоры, но, когда их численность становится ненормальной, например, из-за нарушения иммунной системы, или если микроорганизмы попадают и заселяют те участки тела, которые не должны быть ими колонизированными или стерильными, то это приводит к патологическим состояниям организма, например, к сепсису [9].

Исследования микробиома человека показали, что в человеческом организме обитают тысячи видов бактерий с определенными особенностями в зависимости от частей тела. Такие участки, как родовые пути и кожные покровы обладают меньшим видовым разнообразием, в отличие от ротовой полости и кишечника, где существует большее количество различных видов бактерий [10].

1.1.1 Кожа

Кожные покровы служат барьером для попадания внутрь тела патогенных микроорганизмов и являются постоянным или временным местом их обитания. Типы микроорганизмов, постоянно живущих на коже различаются в зависимости от частей тела. Большинство из них колонизируются на поверхностных клетках кожи или в железах внешней секреции [11]. Исследования показали, что большинство бактерий принадлежит к четырем типам: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* [12].

1.1.2 Слизистая оболочка глаз

Так как в слезе содержится бактерицид лизоцим, то микробам трудно колонизировать слизистую глаза, но некоторым бактериям, таким как

Staphylococcus, *Streptococcus*, *Haemophilus* и *Neisseria* это нередко удается [12, 13].

1.1.3 ЖКТ

Заселение желудочно-кишечного тракта происходит с рождением и в зависимости от того, каким образом был рожден младенец, естественным путем или кесаревым сечением, микробиота имеет отличия [14].

Так, при рождении неестественным путем, преобладает более патогенная микрофлора, такая как *Escherichia coli* и *Staphylococcus*. Также появление ребенка при помощи кесарева увеличивает время развития полезной микрофлоры. У младенцев, которые появились на свет естественным, вагинальным путем сразу преобладает нормальная микробиота, которая по видовому составу похожа на материнскую [15].

Микроорганизмы в кишечнике помогают усваивать клетчатку, некоторые жирные кислоты, участвуют в синтезе витаминов группы В, витамина К, метаболизме жёлчных кислот, стероидов и ксенобиотиков [11, 16]. В результате своей жизнедеятельности бактерии-пробиотики производят гормоноподобные вещества, и можно говорить о том, что микробиота обладает эндокринноподобной функцией [16]. Данные о нарушениях микрофлоры кишечника коррелирует со многими воспалительными и аутоиммунными заболеваниями [17, 18].

1.1.4 Влагалище

Микробиота влагалища играет значимую роль в защите от инфекционных заболеваний и поддержании здорового состояния родовых путей [19]. Наиболее распространенные виды, которые присутствуют во влагалище в период пременопаузы - это *Lactobacillus*. Они сдерживают рост патогенной микрофлоры, выделяя перексид водорода и молочную кислоту [19, 20, 21].

1.1.5 Ротовая полость

В ротовой полости благоприятные условия для роста и развития микроорганизмов: влажность, большое количество питательных веществ и подходящая температура [11]. Видовой состав ротовой полости достаточно велик и разнообразен, наиболее распространенные роды нормальной микрофлоры рта включают: *Actinomyces*, *Arachnia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Leptotrichia*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Veillella*, *Trepone* [22]. Слюна выполняет регулирующую функцию в поддержании нормального количества микроорганизмов в ротовой полости, поставляя питательные вещества, влагу, а также вымывает лишнюю биопленку [23, 24].

1.1.6 Легкие

Верхние и нижние дыхательные пути имеют механические средства для удаления бактерий. Выделения, производимые бокаловидными клетками, захватывают микроорганизмы и через непрерывно движущиеся клетки ресничного эпителия они удаляются. Также в слизи содержится лизоцим, который также регулирует количество микробов в дыхательных путях [11]. Легочная микробиота включает в себя: *Prevotella*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Fusobacterium*, *Megasphaera*, *Veillonella*, *Staphylococcus*, и *Streptococcus*. Стоит отметить, что некоторые из видов, которые присутствуют в нормальной микробиоте дыхательных путей, в случае ослабления иммунитета, могут вызвать заболевания. Потенциально опасными видами являются: *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, и *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* [25].

1.2 Заболевания, связанные с нарушением микробиома

Микробиом и иммунная система постоянно формируют друг друга, определяя неустойчивое равновесие здорового человека. Микробиом все чаще участвует в дисиммунных заболеваниях, таких как аллергия, астма, аутоиммунных заболеваниях, а также первичный или приобретенный иммунодефицит. Нынешние эпидемии аллергических заболеваний и астмы уже давно связаны с микробной средой через гигиеническую гипотезу. Прогресс в понимании функционирования микробиомно-иммунной системы объяснил тесную связь между микробными сообществами и развитием аллергических заболеваний и астмы. Нарушение микробиома влияет на иммунный ответ хозяина и открывает путь к патогенезу заболевания. И наоборот, болезни и терапевтические вмешательства влияют на микробные сообщества [26].

В частности, было показано, что микробиота кишечника модулирует врожденную иммунную систему человека через рецептор Dectin-1 [27]. Дисбиоз кишечника связан с воспалением кишечника; особенно обострение колита, связанное с изменением видового состава сообществ кишечника, происходило у мышей, получавших антибактериальные препараты [28].

Сдвиги в составе бактериального микробиома наблюдались при различных хронических заболеваниях, в том числе при воспалительных заболеваниях кишечника [29, 30, 31] или при дыхательных муковисцидозах больных [32].

За последние полвека аллергические заболевания переросли в эпидемии [33]. Такая быстрая эволюция не связана с генетикой. Изменения окружающей среды и образа жизни вскоре были определены в качестве ключевых факторов [34] через изменения микробиома человека и связанных с ним иммунных реакций [35, 36]. Потеря биоразнообразия и изменение климата усиливают нарушения микробиома, обусловленные окружающей средой. Кроме того, внешние факторы среды, такие как загрязнители воздуха, воздействие табака, биозагрязнители и даже диета, оказывают

эпигенетическое воздействие, которое было связано с возникновением аллергических заболеваний у потомства [37].

1.2.1 Воспалительное заболевание кишечника (ВЗК)

Нарушения состава и функции бактериальной и грибковой микробиоты кишечника связаны с различными формами ВЗК, включая болезнь Крона (БК) и язвенный колит [38, 39, 40, 41, 42]. Оба варианта демонстрируют потерю разнообразия кишечных бактерий [41, 43] и рост специфических бактериальных типов, таких как *Enterobacteriaceae* [43]. Распространение энтеробактерий было связано с первично возникшей БК, а целенаправленное истощение этого семейства бактерий усиливает воспаление кишечника у мышей [44]. Кроме того, потеря некоторых симбиотических таксонов, таких как *Faecalibacterium prausnitzii*, была связана с рецидивом БК, и добавление мышам этого организма уменьшало воспаление в модели химически индуцированного колита [38], что указывает на противовоспалительную функцию для этого кишечного симбионта, связанного со слизистой оболочкой. Совсем недавно биоактивная микробная противовоспалительная молекула была идентифицирована в супернатанте культивируемых *F. Prausnitzii* [45] и считается, что он отвечает, по крайней мере частично, за уменьшение воспаления кишечника. Действительно, добавление мышей *Lactococcus lactis*, экспрессирующих микробную противовоспалительную молекулу *F. prausnitzii*, уменьшало воспаление кишечника [45, 46].

Следовательно, дисбиоз, связанный с потерей кишечных бактерий, способных подавлять кишечное воспаление, также предполагает, что манипуляции с микробиомом, особенно добавление штаммов, восстанавливающих истощенные микробные функции у больных пациентов, представляет собой вероятный путь терапевтического вмешательства.

1.2.2 Стойкий колит, вызванный антибиотиками

Вызванные антибиотиками изменения в микробиоме кишечника и связанном с ним метаболоме снижают устойчивость к колонизации против спорообразующего, продуцирующего токсины патогена *Clostridium difficile* [47], возбудителя антибиотико-ассоциированного колита. Считается, что прорастанию и разрастанию этого патогена способствует уменьшение вторичных метаболитов желчных кислот, происходящих из микробиоты, которые ингибируют прорастание спор [48]. Используя математическое моделирование на основе анализа микробиоты госпитализированных пациентов, недавнее исследование идентифицировало *Clostridium scindens* как вид кишечных бактерий, которые дегидроксилируют желчную кислоту, тем самым опосредуя устойчивость к колонизации против *C. Difficile* [48]. Эти результаты обнадеживают как первые шаги к изучению новых профилактических стратегий, таких как профилактические микробные добавки, для групп риска развития антибиотико-ассоциированного колита.

1.2.3 Атопическая астма

Быстрый рост распространенности астмы в промышленно развитых странах за последние несколько десятилетий, особенно среди педиатрического населения, не может быть объяснен только генетическими факторами риска и считается связанным с изменением воздействия окружающей среды, связанным с западным образом жизни. Ряд подтвержденных эпидемиологических наблюдений указывает на то, что воздействие окружающей среды в раннем детстве повышает риск развития астмы у детей. Известно, что многие из этих воздействий, включая кесарево сечение [49, 50, 51, 52, 53], прием антимикробных препаратов [54, 55, 56, 57], кормление смесями, воздействие пушных домашних животных и токсины окружающей среды [58, 59] формируют зарождающийся микробиом кишечника.

Дисбиоз микробиоты в раннем возрасте также наблюдался у младенцев с риском развития астмы в более позднем возрасте. Бактериальное истощение и распространение грибков наблюдались в кишечном микробиоме детей из группы риска в возрасте 1 мес. При этом фекальный метаболический профиль характеризовался истощением ω -3 жирных кислот и предшественников простагландинов [60].

Наблюдения за независимыми, географически разными когортами рождения, включающими различные социально-экономические и расовые группы, неизменно указывают на истощение симбиотических бактериальных таксонов, таких как *Faecalibacterium*, *Akkermansia* и *Lachnospira*, у младенцев с риском развития атопии или астмы [60, 61, 62]. Эти исследования дополняют растущее количество доказательств того, что нарушения микробиома кишечника в раннем возрасте способствуют развитию астмы у детей, выделяя неонатальный период как благоприятное время для профилактических микробных вмешательств у младенцев из группы высокого риска.

1.2.4 Ожирение и сахарный диабет 2 типа (СД2)

Ожирение и СД2 взаимосвязаны и связаны с дисбиотической микробиотой кишечника [63]. Снижение относительной численности *Bacteroides spp.* особенно заметно при ожирении [64]. Виды бактерий (в частности, *Bacteroides spp.*), ассоциированные с худым фенотипом, по-видимому, преобладали над видами, ассоциированными с ожирением, поскольку подсадка мышей, несущих «тощую» микробиоту, к тем, у которых есть «тучная» микробиота, предотвращало увеличение веса и метаболические фенотипы, связанные с ожирением. Точно так же трансплантация фекальной микробиоты от здоровых худых доноров пациентам с ожирением привела к повышению чувствительности к инсулину [65].

1.2.5 Сердечно-сосудистые заболевания

Было показано, что микробный метаболизм диетического холина и карнитина, которые составляют значительный компонент западной диеты, увеличивает риск сердечно-сосудистых заболеваний [66]. Метаболизм этих соединений производит триметиламин (ТМА), который окисляется в печени до триметиламин- N- оксида, оксида амина, связанного с развитием атеросклероза [67].

Производство ТМА катализируется микробной ТМА-лиазой [68], и ингибирование этого фермента снижает развитие атеросклеротических бляшек у восприимчивых людей. Кроме того, добавление *A. muciniphila* мышам, склонных к атеросклерозу, защищало от развития атеросклероза, вызванного кормлением западной диетой [69]. Действительно, мыши с высоким уровнем метаболизирующих холин бактерий более восприимчивы к метаболическим заболеваниям, вызванным диетой [70].

Модуляция микробного метаболизма посредством диетического вмешательства или прямого приема добавок может, таким образом, обеспечить эффективную стратегию, либо отдельно, либо в сочетании с установленными методами лечения, для предотвращения сердечно-сосудистых заболеваний.

1.2.6 Ревматоидный артрит

Ревматоидный артрит (РА) - это системное аутоиммунное воспалительное состояние, которое проявляется в повреждении суставов. У пациентов с РА наблюдается экспансия кишечной *Prevotella copri*, а аутоантигены у этих пациентов проявляют высокую гомологию с пептидами, ассоциированными с *Prevotella* [71]. Молекулярная мимикрия антигенов, ассоциированных с РА, микробиотой кишечника также была описана в метагеномном исследовании пациентов с РА [72]. Однако еще предстоит выяснить, может ли точное редактирование микробиоты облегчить клинические симптомы у пациентов с РА.

1.3 Микробиом, как терапевтическая мишень

Учитывая тесное взаимодействие между симбионтами кишечных микробов и иммунитетом хозяина, усилия были сосредоточены на реализации различных стратегий, направленных на микробиоту кишечника, для управления или предотвращения хронических воспалительных заболеваний. Клинические подходы к изменению микробиоты кишечника обычно сосредоточены на истощении избыточных видов или общей микробной нагрузки с помощью антибиотиков или противогрибковых средств, модуляции с помощью изменения диеты или добавления живых микробов (одиночных или смешанных видов).

Совсем недавно трансплантация фекальных микробов (FMT) использовалась при различных инфекционных, неврологических и желудочно-кишечных заболеваниях с многообещающими результатами. Хотя противомикробные препараты обычно не считаются подходящими для длительного лечения хронических состояний, учитывая необходимость повторного дозирования и опасения по поводу возникновения устойчивости к противомикробным препаратам, Ранние данные показывали, что введение противомикробных препаратов в качестве средства уничтожения патогенных микробиомов перед FMT или микробными добавками усиливает приживление полезных видов и повышает эффективность лечения [73].

1.3.1 Трансплантация фекальной микробиоты

Трансплантация фекальной микробиоты (FMT) - это введение раствора фекалий от донора в кишечник реципиента с целью прямого изменения микробного состава реципиента и улучшения здоровья [74, 75]. Первое известное описание использования фекалий в качестве терапии было описано Ге Хонгом в Китае в четвертом веке для лечения различных состояний, включая диарею [76]. Процесс обычно включает в себя сначала выбор донора

без семейного анамнеза аутоиммунных, метаболических и злокачественных заболеваний и скрининг на любые потенциальные патогены. Затем фекалии готовят путем смешивания с водой или физиологическим раствором с последующей стадией фильтрации для удаления любых твердых частиц. Смесь можно вводить через назогастральный зонд, эзофагогастродуоденоскопию, колоноскопию или удерживающую клизму. Большая часть клинического опыта с FMT была получена при лечении рецидивирующей или резистентной инфекции *Clostridium difficile* (CD) [75].

1.4 Генетическая система бактерий

Бактериальная хромосома - это молекула ДНК, которая функционирует как самовоспроизводящийся генетический элемент (репликон). Внехромосомные генетические элементы, такие как плазмиды и бактериофаги, являются несущественными репликонами, которые часто определяют устойчивость к антимикробным агентам, выработку факторов вирулентности или другие функции. Хромосома полуконсервативно реплицируется; каждая цепь ДНК служит матрицей для синтеза своей комплементарной цепи [77].

Бактериальные геномы различаются по размеру от $0,4 \times 10^9$ до $8,6 \times 10^9$ дальтон (Да), некоторые из самых мелких из них принадлежат облигатным паразитам (микоплазма), а самые крупные принадлежат бактериям, способным к сложной дифференциации, таким как *Mycobacterium*. Количество ДНК в геноме определяет максимальный объем информации, которую он может кодировать. Большинство бактерий имеют гаплоидный геном, единственную хромосому, состоящую из кольцевой двухцепочечной молекулы ДНК. Линейные хромосомы были обнаружены у грамположительных *Borrelia* и *Streptomyces spp.*, а у грамотрицательных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* присутствует одна линейная и одна круговая хромосомы. Одна хромосома кишечной бактерии *E. coli* имеет

размер 3×10^9 Да (4500 пар оснований), что составляет примерно 2–3 процента от сухой массы клетки *E.coli*, геном составляет лишь около 0,1% от всей массы бактерии [78].

1.5 Ген 16S rRNA

Последовательность нуклеотидов рибосомной РНК 16S широко используется при классификации и идентификации бактерий и архей. Сравнение почти полных последовательностей гена 16S рРНК широко используется для установления таксономических взаимоотношений между прокариотическими штаммами, при этом сходство 98,65% в настоящее время признано пороговым значением для разграничения видов. Сравнение последовательности гена 16S рРНК с последовательностями типовых штаммов всех видов прокариот обеспечивает точный и удобный способ рутинной классификации и идентификации прокариот [79].

Использование последовательностей гена 16S рРНК для изучения бактериальной филогении и таксономии на сегодняшний день является наиболее распространенным генетическим маркером, используемым по ряду причин. Эти причины включают: его присутствие почти во всех бактериях, функция гена 16S рРНК с течением времени не изменилась, что позволяет предположить, что случайные изменения последовательности являются более точной мерой времени. Данный ген имеет как консервативные участки, одинаковые для прокариот, так и видоспецифичные. Консервативные участки служат для первого этапа полимеразной цепной реакции — присоединения праймеров к исследуемой ДНК, а видоспецифичные — для определения видов. К тому же степень схожести видоспецифичных участков очень хорошо отражает эволюционное родство разных видов [80].

1.6 ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР), которую иногда называют «молекулярным фотокопированием», представляет собой быстрый и недорогой метод, используемый для «амплификации» - копирования небольших сегментов ДНК. Поскольку для молекулярного и генетического анализа необходимы значительные количества образца ДНК, исследования изолированных фрагментов ДНК практически невозможны без ПЦР-амплификации.

ПЦР, которую часто называют одним из самых важных научных достижений в молекулярной биологии, произвела революцию в изучении ДНК до такой степени, что ее создатель, Кэри Б. Маллис, был удостоен Нобелевской премии по химии в 1993 году [81].

Чтобы амплифицировать сегмент ДНК с помощью ПЦР, образец сначала нагревают, чтобы ДНК денатурировалась или разделялась на две части одноцепочечной ДНК. Затем фермент под названием «полимераза Таq» синтезирует - строит - две новые цепи ДНК, используя исходные цепи в качестве матриц. Этот процесс приводит к дублированию исходной ДНК, при этом каждая из новых молекул содержит одну старую и одну новую цепь ДНК. Затем каждую из этих нитей можно использовать для создания двух новых копий и так далее, и так далее. Цикл денатурирования и синтеза новой ДНК повторяется от 30 до 40 раз, в результате чего получается более одного миллиарда точных копий исходного сегмента ДНК.

Весь цикл ПЦР автоматизирован и может быть завершен всего за несколько часов. Он управляется машиной, называемой термоциклером, которая запрограммирована на изменение температуры реакции каждые несколько минут, чтобы обеспечить денатурирование и синтез ДНК.

Для проведения ПЦР требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.

- Два праймера - искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 18 до 30 п.н., идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы.).
- Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.
- Дезоксинуклеотидтрифосфаты (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.
- Ионы Mg²⁺, необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — рН, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.
- Анализируемый образец - подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который содержит искомую ДНК. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется

Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется [82].

1.7 ПДРФ

Метод анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) — это способ исследования геномной ДНК, путём разрезания ампликонов ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путём гель-электрофореза (ДНК электрофореза).

Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы — группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных ДНК в большинстве прокариотических (бактерии и сине-зеленые водоросли) и некоторых других организмах и выполняющие тем самым "иммунную" функцию. Это ферменты, «узнающие» определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК.

Специфический паттерн ПДРФ возникает при электрофоретическом разделении расщепленной ДНК, в результате чего образуются фрагменты расщепления различной длины, которые характерны для последовательности ДНК. Индивидуумы, виды или организмы можно различать на основе шаблона ПДРФ. ПДРФ широко используются для идентификации микроорганизмов, генотипирования, снятия отпечатков ДНК, картирования генов и диагностики генетических нарушений [83].

1.8 Электрофорез в геле

Гель-электрофорез - это лабораторный метод, используемый для разделения смесей ДНК, РНК или белков в зависимости от размера молекул. При гель-электрофорезе разделяемые молекулы проталкиваются электрическим полем через гель, содержащий маленькие поры. Молекулы проходят через поры геля со скоростью, которая обратно пропорциональна их длине. Это означает, что небольшая молекула ДНК пройдет через гель большее расстояние, чем более крупная молекула ДНК.

Как упоминалось ранее, гель-электрофорез включает электрическое поле, в частности, это поле прикладывается так, что один конец геля имеет

положительный заряд, а другой конец - отрицательный. Поскольку ДНК и РНК представляют собой отрицательно заряженные молекулы, они будут притягиваться к положительно заряженному концу геля. Наконец, после того, как молекулы ДНК, РНК или белка были разделены с помощью гелеэлектрофореза, могут быть обнаружены полосы, представляющие молекулы разных размеров [84].

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Образцы бактерий были предоставлены нам магистрантами кафедры биотехнологии.

2.2 Методика выделения ДНК

Для выделения ДНК клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а ДНК очистить от других клеточных компонентов.

Методика выделения ДНК обычно включает следующие этапы: 1) лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом); 2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа; 3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл. Затем ДНК осаждают из раствора этанолом и после центрифугирования растворяют осадок в буферном растворе.

Выделение бактериальной геномной ДНК проводили при помощи набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (производства КНР). Набор подходит для быстрого выделения до 20 мг геномной ДНК из $1,0 \times 10^9$ бактериальных клеток. После лизиса отделение геномной ДНК от белков, полисахаридов и липидов достигается с помощью уникальной стадии фазового разделения. Геномная ДНК в нижней фазе выборочно связывается со специальной колонкой AxyPrep для дальнейшей очистки и обессоливания. Высокоочищенная геномная ДНК преимущественно имеет длину 30 т.п.н. и подходит для множества применений, требующих высокоочищенной высокомолекулярной геномной ДНК, таких как ПЦР.

Реактивы:

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

4) Элюирующий раствор

5) Сорбент (водная суспензия)

Ход реакции:

1) Исследуемую пробу, содержащую ДНК, внести в микропробирку.

2) Добавить в пробирку 300 мкл лизирующего раствора (если есть осадок, то предварительно его необходимо перемешать).

3) Перемешать содержимое пробирки и поместить в термостат на 10 мин(для грамположительных бактерий время инкубации 30 минут).

4) Встряхнуть содержимое пробирки на вортексе и центрифугировать 10 мин. при 13,4 тыс. оборотов.

5) С помощью автоматического дозатора отобрать надосадочную жидкость и перенести в чистую пробирку. Затем добавить 20 мкл суспензии сорбента. Перед использованием сорбента, его следует полностью суспендировать на вортексе до исчезновения осадка.

6) Содержимое пробирки с пробой встряхнуть на вортексе и оставить в штативе на 10 мин. для адсорбции ДНК, в течение которых каждые 3 минуты перемешивать для поддержания частиц сорбента во взвешенном состоянии.

7) Пробирки центрифугировать 20 сек. при 13,4 тыс. оборотов.

8) Надосадочную жидкость удалить при помощи автоматического дозатора.

9) К осадку прибавить 500 мкл рабочего отмывочного раствора №1, осадок ресуспендировать, встряхнуть на вортексе.

10) Центрифугировать пробы 30 сек. при 2 тыс. оборотов.

11) Надосадочную жидкость удалить.

12) К осадку прибавить 500 мкл рабочего отмывочного раствора №2, осадок ресуспендировать, встряхнуть на вортексе.

13) Цунтрифугировать пробы 30 сек. при 2 тыс. оборотов. Надосадочную жидкость полностью удалить.

14) Повторить операции, изложенные в пп.12 и 13.

15) Открытую пробирку поместить в термостат и сушить осадок 5 мин. при 65 градусов.

16) К высушенному осадку добавить 75 мкл элюирующего раствора, пробирку закрыть и термостатировать 1-2 мин. при 65 градусов.

17) Пробирку встряхнуть на вортексе для ресуспендирования осадка и термостатировать в прежних условиях еще 5 мин. По окончании термостатирования содержимое пробирки еще раз встряхнуть на вортексе.

18) Центрифугировать 1 мин. при 10 тыс. оборотов. Надосадочную жидкость (препарат ДНК) перенести в чистую пробирку, не задевая при этом осадка. Препарат ДНК непосредственно используется для проведения ПЦР.

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

2.3 Методика проведения ПЦР

Реакция ПЦР проводилась в приборе ThermalCycler C1000.

На одну пробу объемом 50мкл требуется:

- 27 мкл дист. воды

- 5 мкл 10x буфера

- 5 мкл праймеров с концентрациями по 1μM (8L – 1492R)

- 3 мкл $MgCl_2$ с концентрацией 2.5mM

-1 мкл ДНК hot-start taq полимеразы.

Вещества смешивали в 1 пробирке объемом 1,5 мл из расчета на 15 проб, далее в каждую добавляли по 47 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемой ДНК и 1 мкл полимеразы. Для визуализации результатов амплификации использовали электрофорез в агарозном геле. После окончания электрофореза гель помещали в транслюминатор гель-документирующей системы. Проведенный электрофорез ампликонов ДНК показал что реакция ПЦР прошла успешно и мы выделили участки ДНК гена 16S рРНК.

Используемая программа при проведении ПЦР:

1. 940C – 3:00 мин.

2. 800C – 0:40 сек

3. 950C – 0:10 сек.

4. 620C – 0:20 сек.

5. 720C – 1:40 мин.

6. Go to 3 – 35 times

7. 720C for 10: 00 мин.

8. 40C – 18:00:00

9. END

2.4 Методика очистки ампликонов

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

Набор для быстрой очистки PCR продукта, основан на использовании солюбилизирующего агента с хаотропным веществом, в присутствии которого ДНК остается на поверхности сфер шариков сорбента. С последующей отмывкой спиртовым раствором, сферы с ДНК очищаются от ненужных примесей и, элюированная с сорбента бидистиллированной водой или традиционными буферами (TE и др.), ДНК может быть использована для дальнейшего рестрикционного анализа.

Применение набора обеспечило высокую чистоту очищенной ДНК – OD 260/280 – 1.8-2.0.

2.5 Методика проведения реакции рестрикции

Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 2 ч. в приборе Thermomixercomfort производство фирмы Eppendorf. Реакция проходила при 65 0С в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 ед. акт. рестриктазы.

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

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

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

Для визуализации результатов рестрикции использовали электрофорез.

2.6 Гель электрофорез

Гель-электрофорез - это стандартная лабораторная процедура разделения ДНК по размеру (например, длина в парах оснований) для визуализации и

очистки. Электрофорез использует электрическое поле для перемещения отрицательно заряженной ДНК через матрицу агарозного геля к положительному электроду. Более короткие фрагменты ДНК проходят через гель быстрее, чем более длинные. Таким образом, мы можем определить приблизительную длину фрагмента ДНК, прогнав его на агарозном геле рядом с лестницей ДНК (набором фрагментов ДНК известной длины-маркером).

Оборудование для проведения и документирования электрофореза:

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

Реактивы, необходимые для проведения электрофореза:

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

Ход процесса:

1. Взвесить агарозу и добавить ее к соответствующему количеству 0.5x TAE буфера.
2. Поместить в работающую микроволновую печь на 45-50 сек., до получения однородной суспензии, затем остудить до 600 С.

3. Установить гребенку в форму для агарозы (форму выровнять по уровню, для равномерного нанесения раствора).
4. Перелить раствор в форму для агарозы.
5. Оставить гель на 25 минут для застывания.
6. Удалить гребенку и поместить гель в электрофоретическую кювету.
7. Покрыть гель слоем электрофоретического буфера (гель должен быть покрыт буфером, толщина которого 1 см).
8. Смешать пробы ДНК с буфером для нанесения пробы (содержащим глицерин и красители) в соотношении 5:1. Внести смесь в лунки геля под электрофоретический буфер с помощью самплера. Нанести маркер (в 1 и последнюю лунки).
9. Подсоединить электроды, установить напряжение и время, запустить электрофорез.
10. Сверху положить хладагент.
11. После окончания электрофореза достать гель и погрузить его в бромистый этидий для окрашивания и поставить на вортекс, на 25 минут.
12. Промыть гель дистиллированной водой.
13. Окрашенный гель поместить в трансиллюминатор.
14. Рассмотреть гель в ультрафиолетовом свете и документировать полученные изображения.

3 Результаты

3.1 Выделение ДНК из образцов бактерий

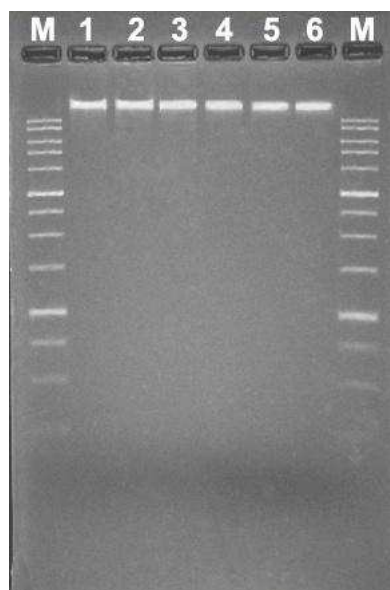
Из одиннадцати образцов определяемых бактерий и двух известных штаммов была выделена суммарная геномная ДНК высокого качества.

(Таблица 1)

Таблица 1 - Концентрация и чистота полученной ДНК

№ Пробы	Концентрация разведение в 10 раз, мкг/мл	Исходная концентрация, мг/мл	Чистота препарата $A_{260}:A_{280}$
1	43	0,43	1,97
2	37	0,37	1,95
3	46	0,46	1,94
4	39	0,39	1,96
5	35	0,35	1,96
6	30	0,3	1,95
7	41	0,41	1,97
8	40	0,4	1,96
9	34	0,34	1,93
10	33	0,33	1,96
11	42	0,42	1,97
<i>Escherichia coli</i> K-12	41	0,41	1,98
<i>Ralstonia eutropha</i> B 5876	37	0,37	1,96

Все образцы были пригодны для дальнейших исследований, так как отношение $A_{260}:A_{280}$ у этих образцов входит в оптимальный диапазон от 1,8 до 2,0.



М – ДНК маркер 1kb

1 – 5 – Исследуемые образцы бактерий

6 – *Ralstonia eutropha* B 5876

Рисунок 1 - Суммарная геномная ДНК бактерий

На рисунке 1 проиллюстрирован результат электрофореза выделенной ДНК исследуемых бактерий, а также ДНК *Ralstonia eutropha* B 5876. Масса выделенной суммарной ДНК каждого из образцов составила более 10 000 пар оснований.

3.2 Получение ампликонов гена 16S-рРНК

Из выделенной ДНК мы получили ампликоны, которые соответствуют выбранному участку гена 16S-рРНК. Это участки, ограниченные последовательностями, комплементарными паре праймеров 500L и 1350R.

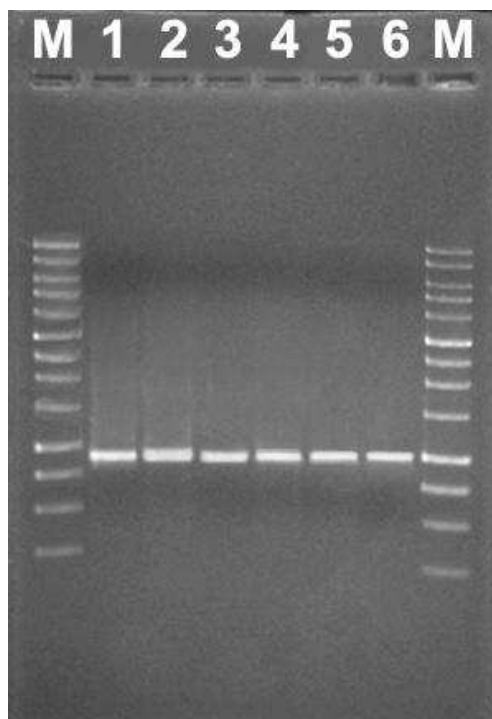
Затем препараты ампликонов подверглись очистке.

Результаты очистки приведены в таблице 2

Таблица 2 - Концентрации и чистота полученных ампликонов

№ Пробы	Концентрация, мг/мл	Чистота препарата $A_{260}:A_{280}$
1	30	1,94
2	27	1,92
3	25	1,91
4	31	1,93
5	35	1,94
6	32	1,93
7	29	1,92
8	26	1,92
9	33	1,94
10	31	1,93
11	27	1,92
<i>Escherichia coli</i> K-12	36	1,94
<i>Ralstonia eutropha</i> B 5876	35	1,93

Все образцы ампликонов были пригодны для дальнейших исследований, так как отношение поглощений $A_{260}:A_{280}$ у этих образцов входит в оптимальный диапазон от 1,8 до 2,0.



М – ДНК маркер 1kb

1–5 Исследуемые образцы бактерий

6– *Escherichia coli* K-12

Рисунок 2 – Ампликоны гена 16S-рРНК бактерий

На рисунке 2 представлен результат электрофореза ампликонов гена 16S-рРНК исследуемых бактерий, а также ампликон *Escherichia coli* K-12. Образцы, не вошедшие в данные электрофореграммы, показали сходные электрофоретические картины. Масса ампликонов составила около 900 п.о. для ампликонов 500L -1350R

3.3 Проведение рестрикции ампликонов 500L – 1350R

Полученные ампликоны были подвергнуты рестриктированию с использованием двух эндонуклеаз рестрикции: Bst MB I и BspFN I.

Таблица 3 - Примерные размеры рестриктов полученные после обработки ампликонов 500L – 1350R эндонуклеазами рестрикции

Образцы бактерий Рестриктазы	<i>Ralstonia Eutropha</i> B 5876	<i>Escherichia coli</i> K-12	1	2, 5	3	4
Bsp FN I	340 290 100 90 40	340 300 140 100	340 300 140 100	300 200 180 90 70	450 300 90 50	430 380
Bst MB I	790 50 50	650 190 50	650 190 50	600 240 50	600 190 50 50	600 190 50 50

Таблица 4 - Примерные размеры рестриктов полученные после обработки ампликонов 500L – 1350R эндонуклеазами рестрикции

Образцы бактерий Рестриктазы	6	7 и 11	8	9	10
Bsp FN I	440 260 110 60	290 170 160 100 90 40	440 260 120 70	440 440	390 300 90 50
Bst MB I	380 350 110 60	770 50 50	380 350 110 50	840 50	780 100

3.4 Проведения анализа *in silico*

На основании морфологических характеристик изученных образцов бактерий были выбраны семь родов бактерий, к которым могли относиться образцы: *Rhizobium*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Roseovarius*. Был проведен рестрикционный анализ *in silico* ампликонов их генов 16S-рРНК с помощью программ pDRAW32. После теоретического рестриктирования ампликонов последовательностей взятых из базы данных GenBank из каждого рода были выбраны подходящие по рестрикционному профилю виды.

Таблица 5 - Размеры рестриктов ампликонов 500L – 1350R полученные после проведения теоретического рестриктирования

Образцы бактерий Рестриктазы	<i>Ralstonia Eutropha B 5876</i>	<i>E. Coli K-12</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
Bsp FN I	339 291 103 87 39 15 14	340 295 141 104 14	340 295 141 104 14	294 209 186 87 50 39 15 14	445 294 87 39 15 14	445 381 39 15 14
Bst MB I	787 51 50	651 193 50	651 193 50	606 238 50	606 187 51 50	606 187 51 50

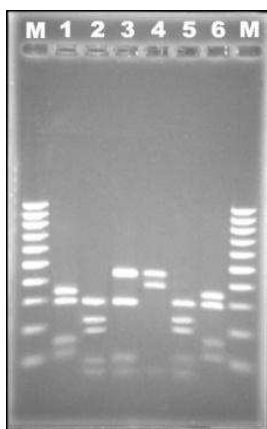
Таблица 6 - Размеры рестриктов ампликонов 500L – 1350R полученные после проведения теоретического рестриктирования

Образцы бактерий Рестриктазы	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Agrobacterium timefaciens</i>	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	<i>Roseovarius tolerans</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Bsp FN I	438 260 118 68 14	444 439 14	291 185 154 104 87 39 15 14	438 260 118 68 14	392 296 87 50 39 15 14 2
Bst MB I	378 353 114 53	845 52	774 52 51 12	378 353 114 53	780 103 12

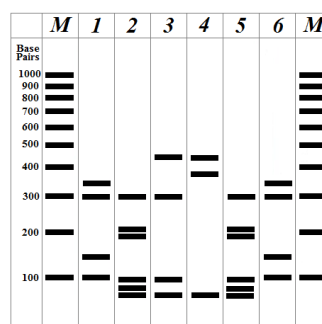
3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных

После проведения анализа *in silico* были составлены теоретические электрофореграммы, которые мы сравнили с практическими, полученными после электрофоретического разделения продуктов гидролиза ампликонов.

На рисунках 3-10 представлены в сравнении практические и теоретические электрофореграммы продуктов амплификации гена 16S-рРНК бактерий после гидролиза ампликонов разными рестриктазами.

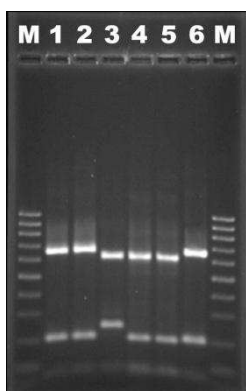


М – Маркер 100 бр
 1 – Образец 1
 2 – Образец 2
 3 – Образец 3
 4 – Образец 4
 5 – Образец 5
 6 – *E. coli K-12*
 Рисунок 3 -
 Электрофоретическое
 разделение после
 обработки рестриктазой
 BspFN I

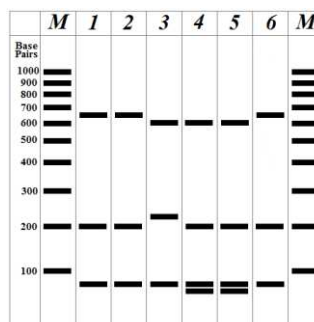


М – Маркер 100 бр
 1 – *E. coli*
 2 – *Bacillus cereus*
 3 – *Bacillus subtilis*
 4 – *Bacillus pumilus*
 5 – *Bacillus cereus*
 6 – *E. coli K-12*
 Рисунок 4 -
 Теоретически
 рассчитанные картины
 электрофоретического
 разделения для
 рестриктазы BspFN I

На данных электрофореграммах наблюдается четыре типа распределения рестриктов. Образец 3 является представителем вида *Bacillus subtilis*, образец 2 - *Bacillus cereus*, образец 1 - *Escherichia coli*, а образец 4 - *Bacillus pumilus*

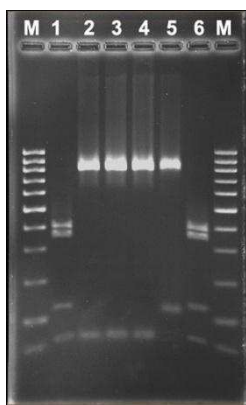


М – Маркер 100 бр
 1 – *E. coli K-12*
 2 – Образец 1
 3 – Образец 2
 4 – Образец 3
 5 – Образец 4
 6 – *E. coli K-12*
 Рисунок 5 -
 Электрофоретическое
 разделение после
 обработки рестриктазой
 Bst MB I

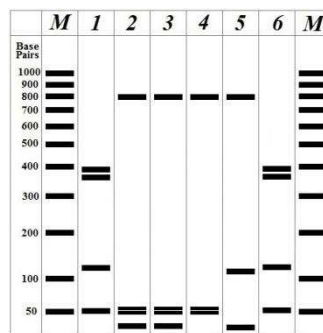


М – Маркер 100 бр
 1 – *E. coli K-12*
 2 – *E. coli*
 3 – *B. cereus*
 4 – *B. subtilis*
 5 – *B. pumilus*
 6 – *E. coli K-12*
 Рисунок 6 -
 Теоретически
 рассчитанные картины
 электрофоретического
 разделения для
 рестриктазы Bst MB I

На электрофоретических картинах, представленных на рисунках, наблюдается 4 типа рестрикционных профилей. Одинаковые профили рестрикции имеют образцы 1 и *E. coli K-12*; 4 и 3. При использовании данной рестриктазы удалось отличить 2 образец от других. Образец 1 – это *Escherichia coli*, образец 2 является *B. cereus*, образец 3 - *B. subtilis*. Таким образом рестриктаза Bst MB I позволяет различить разные виды рода *Bacillus*

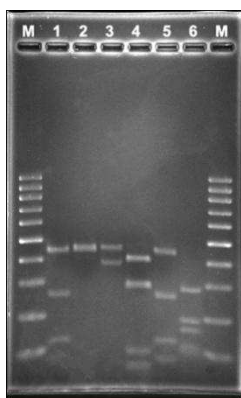


М – ДНК Маркер 100+50pb
 1 - Образец 6
 2 - Образец 7
 3 - Образец 11
 4 - *R. eutropha* В 5876
 5 - Образец 10
 6 - Образец 8
 Рисунок 7 -
 Электрофоретическое
 разделение после
 обработки рестриктазой
 Bst MB I

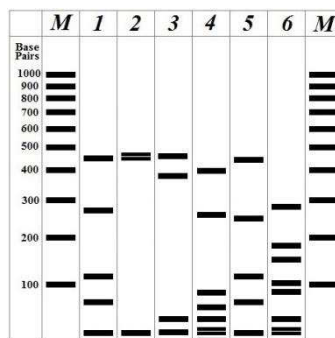


М – ДНК Маркер 100+50pb
 1 - *A. globiformis*
 2 - *A. xylosoxidans*
 3 - *A. xylosoxidans*
 4 - *R. eutropha*
 5 - *P. fluorescens*
 6 - *R. tolerans*
 Рисунок 8 - Теоретически
 рассчитанные картины
 электрофоретического
 разделения для
 рестриктазы Bst MB I

При использовании для данных образцов рестриктазы Bst MB I наблюдается три вида рестрикционных профилей. Одинаковое распределение показывают образцы 6 и 8; 7, 11 и *R. eutropha*. У образца под номером 10 иная картина рестрикции. Значит он принадлежит к другому роду бактерий в отличие от остальных.



М – ДНК Маркер 100pb
 1 - Образец 6
 2 - Образец 9
 3 - Образец 4
 4 - Образец 10
 5 - Образец 8
 6 - Образец 7
 Рисунок 9 –
 Электрофоретическое
 разделение после
 обработки рестриктазой
 BspFN I



М – ДНК Маркер 100pb
 1 - *A. globiformis*
 2 - *A. tumefaciens*
 3 - *B. pumilus*
 4 - *P. fluorescens*
 5 - *R. tolerans*
 6 - *A. Xylosoxidans*
 Рисунок 10 -
 Теоретически
 рассчитанные картины
 электрофоретического
 разделения для
 рестриктазы BspFN I

При использовании данной рестриктазы у всех образцов наблюдается разный рестрикционный профиль, что позволяет сразу отличить все исследуемые образцы друг от друга.

Исходя из сравнения теоретических и практических электрофореграмм, исследуемые образцы бактерий являются представителями видов:

Образец 1 – *Escherichia coli*

Образцы 2 и 5 – *Bacillus cereus*

Образец 3 – *Bacillus subtilis*

Образец 4 – *Bacillus pumilus*

Образец 6 – *Arthrobacter globiformis*

Образцы 7 и 11 – *Achromobacter xylosoxidans*

Образец 8 – *Roseovarius tolerans*

Образец 9 – *Agrobacterium tumefaciens*

Образец 10 – *Pseudomonas fluorescens*

Более информативной для определения оказалась рестриктаза BspFN I, так как при ее использовании наблюдаются разные картины распределения рестриктов для всех исследованных образцов.

Заключение

Методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов была определена видовая принадлежность 11 образцов бактерий. В процессе проделанной работы была выделена высококачественная ДНК бактерий и проведена ее очистка. Используя ПЦР мы получили ампликоны размером 900 п.о. гена 16S рибосомальной РНК. Также был проведен рестрикционный анализ исследуемых ампликонов. Полученные данные мы сравнили с электрофореграммами из нашей базы данных теоретических электрофореограмм. По результатам исследования образцы бактерий оказались представителями видов: *Arthrobacter globiformis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Roseovarius tolerans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DNA - deoxyribonucleic acid

FMT - Fecal Microbiota Transplantation

bp - base pairs

БК – болезнь Крона

ВЗК – воспалительное заболевание кишечника

дАТФ – дезоксиаденозин трифосфат

дТТФ – дезокситимидин трифосфат

Да - дальтон

дГТФ – дезоксигуанозин трифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксинуклеозид трифосфаты

дЦТФ – дезоксицитидин трифосфат

ЖКТ – желудочно–кишечный тракт

п.о. - пары оснований

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РА – ревматоидный артрит

РНК - рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

СД2 - сахарный диабет 2 типа

ТМА – триметиламин

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Sender, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body / R. Sender, S. Fuchs, R. Milo // PLoS biology. – 2016. – Т. 14. – №. 8. – С. e1002533.
2. Bäckhed, F. Host-bacterial mutualism in the human intestine / F. Bäckhed, R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson, J.I. Gordon // Science. – 2005. – Т. 307, №. 5717. – С. 1915-1920.
3. Hooper, L. V. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine / L.V. Hooper, T. Midtvedt, J.I. Gordon // Annual review of nutrition. – 2002. – Т. 22, №. 1. – С. 283-307.
4. Bonfrate, L. Microbiota in health and irritable bowel syndrome: current knowledge, perspectives and therapeutic options / L. Bonfrate, J. Tack, I. Grattagliano, R. Cuomo, P. Portincasa // Scandinavian journal of gastroenterology. – 2013. – Т. 48, №. 9. – С. 995-1009.
5. Cho, I. The human microbiome: at the interface of health and disease / I. Cho, M.J. Blaser // Nature Reviews Genetics. – 2012. – Т. 13, №. 4. – С. 260-270.
6. Определитель бактерий Берджи. / Под ред. Хоулта Дж. и др.: 9-е издание в 2-х томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина, - Москва, 1997
7. Bentley, R. W. Intrageneric structure of Streptococcus based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences / R.W. Bentley, J.A. Leigh, M.D. Collins // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1991. – Т. 41, №. 4. – С. 487-494.
8. Jayarao, B. M. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA of Streptococcus and Enterococcus species of bovine origin / B.M. Jayarao, J.J. Dore Jr, S.P. Oliver // Journal of Clinical Microbiology. – 1992. – Т. 30, №. 9. – С. 2235.

9. Van Amersfoort, E. S. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock / E. S. Van Amersfoort, T.J.C. Van Berkel, J. Kuiper // *Clinical microbiology reviews*. – 2003. – Т. 16, №. 3. – С. 379.
10. Peterson, J. The NIH human microbiome project / J. Peterson et al. // *Genome research*. – 2009. – Т. 19, №. 12. – С. 2317-2323.
11. Willey, J. M. Prescott's microbiology / J. Willey, L. Sherwood, C.J. Woolverton // New York : McGraw-Hill, 2011. – Т. 7. – С. 713—721.
12. Cui, L., Morris A., Ghedin E. The human mycobiome in health and disease / L. Cui, A. Morris, Ghedin // *Genome medicine*. – 2013. – Т. 5, №. 7. – С. 1-12.
13. The Normal Bacterial Flora of Humans [Электронный ресурс] - Режим доступа: http://www.textbookofbacteriology.net/normalflora_3.html
14. Yang, I. The infant microbiome: implications for infant health and neurocognitive development / I. Yang, E.J. Corwin, P.A. Brennan, S. Jordan, J.R. Murphy, A. Dunlop // *Nursing research*. – 2016. – Т. 65, №. 1. – С. 76.
15. Wall, R. Role of gut microbiota in early infant development / R. Wall et al. // *Clinical medicine. Pediatrics*. – 2009. – Т. 3. – С. CMPed. S2008.
16. Clarke, G. Minireview: gut microbiota: the neglected endocrine organ / G. Clarke et al. // *Molecular endocrinology*. – 2014. – Т. 28, №. 8. – С. 1221-1238.
17. Quigley, E. M. Gut bacteria in health and disease / E. M. Quigley // *Gastroenterology & hepatology*. – 2013. – Т. 9, №. 9. – С. 560.
18. Shen, S. Bugging inflammation: role of the gut microbiota / S. Shen, C. H. Wong // *Clinical & translational immunology*. – 2016. – Т. 5, №. 4. – С. e72.
19. Petrova, M. I. Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health / M. I. Petrova, E. Lievens, S. Malik, N. Imholz, S. Lebeer // *Frontiers in physiology*. – 2015. – Т. 6. – С. 81.

20. Wang, Z. K. Fungal microbiota and digestive diseases / Z. K. Wang, Y.S. Yang, A.T. Stefka, G. Sun, L.H. Peng // *Alimentary pharmacology & therapeutics*. – 2014. – T. 39, №. 8. – C. 751-766.
21. Witkin, S. S. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation / S. S. Witkin, I. M. Linhares, P. Giraldo // *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. – 2007. – T. 21, №. 3. – C. 347-354.
22. Sutter, V. L. Anaerobes as normal oral flora / V. L. Sutter // *Reviews of infectious diseases*. – 1984. – T. 6, №. Supplement_1. – C. S62-S66.
23. Schwartz, A. *Microbiota of the Human Body // Implications in Health*. – 2016. — C. 45—60.
24. Avila, M. The oral microbiota: living with a permanent guest / M. Avila, D. M. Ojcius, Ö. Yilmaz // *DNA and cell biology*. – 2009. – T. 28, №. 8. – C. 405-411.
25. Ghannoum, M. A. The human mycobiome and its impact on health and disease / M. A. Ghannoum, P. K. Mukherjee // *Current Fungal Infection Reports*. – 2013. – T. 7, №. 4. – C. 345-350.
26. Mezouar, S. Microbiome and the immune system: From a healthy steady-state to allergy associated disruption / S. Mezouar et al. // *Human Microbiome Journal*. – 2018. – T. 10. – C. 11-20.
27. Iliev, I. D. et al. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis / I. D. Iliev et al. // *Science*. – 2012. – T. 336. – №. 6086. – C. 1314-1317.
28. Wheeler, M. L. Immunological consequences of intestinal fungal dysbiosis / M. L. Wheeler et al. // *Cell host & microbe*. – 2016. – T. 19, №. 6. – C. 865-873.
29. Ott, S. J. Fungi and inflammatory bowel diseases: alterations of composition and diversity / S. J. Ott et al. // *Scandinavian journal of gastroenterology*. – 2008. – T. 43, №. 7. – C. 831-841.

30. Hoarau, G. Bacteriome and mycobiome interactions underscore microbial dysbiosis in familial Crohn's disease / G. Hoarau et al. // *MBio*. – 2016. – T. 7, №. 5.
31. Sokol, H. Fungal microbiota dysbiosis in IBD / H. Sokol et al. // *Gut*. – 2017. – T. 66, №. 6. – C. 1039-1048.
32. Kim, S. H. Global analysis of the fungal microbiome in cystic fibrosis patients reveals loss of function of the transcriptional repressor Nrg1 as a mechanism of pathogen adaptation / S. H. Kim et al. // *PLoS pathogens*. – 2015. – T. 11, №. 11. – C. e1005308.
33. Platts-Mills, T. A. The allergy epidemics: 1870-2010 / T. A. Platts-Mills // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2015. – T. 136, №. 1. – C. 3-13.
34. Strachan, D. P. Hay fever, hygiene, and household size / D. P. Strachan // *BMJ: British Medical Journal*. – 1989. – T. 299, №. 6710. – C. 1259.
35. Stein, M. M. Innate immunity and asthma risk in Amish and Hutterite farm children / M. M. Stein et al. // *New England journal of medicine*. – 2016. – T. 375, №. 5. – C. 411-421.
36. Ober, C. Immune development and environment: lessons from Amish and Hutterite children / C. Ober, A.I. Sperling, E. von Mutius, D. Vercelli // *Current opinion in immunology*. – 2017. – T. 48. – C. 51-60.
37. Cecchi, L. External exposome and allergic respiratory and skin diseases / L. Cecchi, G. D'Amato, I. Annesi-Maesano // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2018. – T. 141, №. 3. – C. 846-857.
38. Sokol, H. Fungal microbiota dysbiosis in IBD / H. Sokol et al. // *Gut*. – 2017. – T. 66, №. 6. – C. 1039-1048.
39. Kudelka, M. R. Cosmc is an X-linked inflammatory bowel disease risk gene that spatially regulates gut microbiota and contributes to sex-specific risk / M. R.

Kudelka et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – T. 113, №. 51. – C. 14787-14792.

40. Lamas, B. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands / B. Lamas et al. // Nature medicine. – 2016. – T. 22, №. 6. – C. 598-605.

41. Mar, J. S. Disease severity and immune activity relate to distinct interkingdom gut microbiome states in ethnically distinct ulcerative colitis patients / J. S. Mar et al. // MBio. – 2016. – T. 7, №. 4.

42. Schirmer, M. Dynamics of metatranscription in the inflammatory bowel disease gut microbiome / M. Schirmer et al. // Nature microbiology. – 2018. – T. 3, №. 3. – C. 337-346.

43. Gevers, D. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease / D. Gevers et al. // Cell host & microbe. – 2014. – T. 15, №. 3. – C. 382-392.

44. Zhu, W. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk / W. Zhu et al. // Cell. – 2016. – T. 165, №. 1. – C. 111-124.

45. Quévrain, E. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease / E. Quévrain et al. // Gut. – 2016. – T. 65, №. 3. – C. 415-425.

46. Breyner, N. M. Microbial anti-inflammatory molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii* shows a protective effect on DNBS and DSS-induced colitis model in mice through inhibition of NF- κ B pathway / N. M. Breyner et al. // Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 114.

47. Theriot, C. M. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection / C. M. Theriot et al. // Nature communications. – 2014. – T. 5, №. 1. – C. 1-10.

48. Buffie, C. G. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile* / C. G. Buffie et al. // *Nature*. – 2015. – T. 517. – №. 7533. – C. 205-208.
49. Dominguez-Bello, M. G. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns / M. G. Dominguez-Bello et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – T. 107. – №. 26. – C. 11971-11975.
50. Jakobsson, H. E. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section / Jakobsson H. E. et al. // *Gut*. – 2014. – T. 63. – №. 4. – C. 559-566.
51. Bäckhed, F. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life / F. Bäckhed et al. // *Cell host & microbe*. – 2015. – T. 17. – №. 5. – C. 690-703.
52. Stokholm, J. Cesarean section changes neonatal gut colonization / J. Stokholm et al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. – T. 138. – №. 3. – C. 881-889. e2.
53. Chu, D. M. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery / D. M. Chu et al. // *Nature medicine*. – 2017. – T. 23. – №. 3. – C. 314-326.
54. Johnson, C. C. Antibiotic exposure in early infancy and risk for childhood atopy / C. C. Johnson et al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2005. – T. 115. – №. 6. – C. 1218-1224.
55. Korpela, K. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children / K. Korpela et al. // *Nature communications*. – 2016. – T. 7. – №. 1. – C. 1-8

56. Ahmadizar, F. Early life antibiotic use and the risk of asthma and asthma exacerbations in children / F. Ahmadizar et al. // *Pediatric Allergy and Immunology*. – 2017. – T. 28. – №. 5. – C. 430-437.
57. Yamamoto-Hanada, K. Influence of antibiotic use in early childhood on asthma and allergic diseases at age 5 / K. Yamamoto-Hanada et al. // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. – 2017. – T. 119. – №. 1. – C. 54-58.
58. Levin, A. M. Joint effects of pregnancy, sociocultural, and environmental factors on early life gut microbiome structure and diversity / A. M. Levin et al. // *Scientific reports*. – 2016. – T. 6. – №. 1. – C. 1-16.
59. O'Connor, G. T. Early-life home environment and risk of asthma among inner-city children / G. T. O'Connor et al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2018. – T. 141. – №. 4. – C. 1468-1475.
60. Fujimura, K. E. Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation / K. E. Fujimura et al. // *Nature medicine*. – 2016. – T. 22. – №. 10. – C. 1187-1191.
61. Arrieta, M. C. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma / M. C. Arrieta et al. // *Science translational medicine*. – 2015. – T. 7. – №. 307. – C. 307ra152-307ra152.
62. Durack, J. Delayed gut microbiota development in high-risk for asthma infants is temporarily modifiable by *Lactobacillus* supplementation / J. Durack et al. // *Nature communications*. – 2018. – T. 9. – №. 1. – C. 1-9.
63. Qin, J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes / J. Qin et al. // *Nature*. – 2012. – T. 490. – №. 7418. – C. 55-60.
64. Andoh, A. Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population / A. Andoh et al. // *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. – 2016. – C. 15-152.

65. Vrieze, A. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome / A. Vrieze et al. // *Gastroenterology*. – 2012. – T. 143. – №. 4. – C. 913-916. e7.
66. Estruch, R. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts / R. Estruch et al // *New England journal of medicine*. – 2018. – T. 378. – №. 25. – C. e34.
67. Wang, Z. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease / Z. Wang et al. // *Nature*. – 2011. – T. 472. – №. 7341. – C. 57-63.
68. Koeth, R. A. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis / R. A. Koeth et al. // *Nature medicine*. – 2013. – T. 19. – №. 5. – C. 576-585.
69. Li, J. *Akkermansia muciniphila* protects against atherosclerosis by preventing metabolic endotoxemia-induced inflammation in Apoe^{-/-} mice / J. Li et al. // *Circulation*. – 2016. – T. 133. – №. 24. – C. 2434-2446.
70. Romano, K. A. Metabolic, epigenetic, and transgenerational effects of gut bacterial choline consumption / K. A. Romano et al. // *Cell host & microbe*. – 2017. – T. 22. – №. 3. – C. 279-290. e7.
71. Scher, J. U. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis / J. U. Scher et al. // *elife*. – 2013. – T. 2. – C. e01202.
72. Zhang, X. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment / X. Zhang et al. // *Nature medicine*. – 2015. – T. 21. – №. 8. – C. 895-905.
73. Keshteli A. H. Pretreatment with antibiotics may enhance the efficacy of fecal microbiota transplantation in ulcerative colitis: a meta-analysis / A. H.

Keshteli, B. Millan, K. L. Madsen // *Mucosal immunology*. – 2017. – Т. 10. – №. 2. – С. 565-566.

74. Bakken, J. S. Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation / J. S. Bakken et al. // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2011. – Т. 9. – №. 12. – С. 1044-1049.

75. Smits, L. P. Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation / L. P. Smits et al. // *Gastroenterology*. – 2013. – Т. 145. – №. 5. – С. 946-953.

76. Zhang, F. Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? / F. Zhang et al. // *The American journal of gastroenterology*. – 2012. – Т. 107. – №. 11. – С. 1755; author reply p. 1755-6.

77. Патрушев, Л. И. Экспрессия генов / Л. И. Патрушев. - Москва : Наука, 2000. - 830 с

78. Квитко, К. В. Генетика микроорганизмов : учебное пособие / К. В. Квитко, И. А. Захаров; под ред. А. В. Пиневича. - Санкт Петербург : Изд. дом СПб. ун-та, 2012. - 268 с.

79. Жимулев, И. Ф. Общая и молекулярная генетика / И. Ф. Жимулев. - Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2003. - 480 с.

80. Колтовая, Н. А. Практикум по молекулярной биологии / Н. А. Колтовая. - Москва : Наука, 2010. - 31 с.

81. Паренков, А. Д. Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Часть 2. Методы молекулярной диагностики : учебно-методическое пособие / А.Д. Перенков [и др.]. – Нижний Новгород : Нижегородский госуниверситет им. И.Н. Лобачевского, 2015. – 40-45 с.

82. Гусейнов, О. А. Методы биохимических исследований : учеб. метод. пособие к лаб. занятиям / О. А. Гусейнов. - Красноярск: Сиб. федерал. университет, 2012. - 46 с.

83. ПДРФ [Электронный ресурс] - Режим доступа:
<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/RFLP.html>

84. Гааль, Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул:
учебник / Э. Гааль, Г. Медьши, Л. Верецкеи - Москва, - 1982. - 447с.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Нишацкая Е. И.

«15» июня 2021г

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01. - Биология

Изучение сапрофитной флоры как компонента микробиома человека

Руководитель



к.б.н., доцент О.А. Гусейнов

Студент ББ17-32Б, №041723663



К.А. Драндрова

Красноярск 2021