

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е. И. Шишацкая
« ____ » _____ 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

«Идентификация бактерий рода *Arthrobacter* методом анализа
полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена 16S рРНК»

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

Выпускник _____ Н.А. Муштукова

Красноярск 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Генетический аппарат бактерий	6
1.2 Ген 16S рРНК.....	8
1.3 Бактерии рода <i>Arthrobacter</i>	9
1.4 Эндонуклеазы рестрикции.....	11
1.4.1 <i>Общая характеристика рестриктаз</i>	11
1.4.2 <i>Классификация</i>	12
1.4.3 <i>Основные сферы применения рестриктаз</i>	13
1.4.4 <i>Особенности работы с эндонуклеазами рестрикции</i>	14
1.5 Полимеразная цепная реакция	15
1.6 Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов	17
1.7 Электрофорез ДНК.....	18
1.8 Генетический анализ <i>in silico</i>	22
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	23
2.1 Объект исследования	23
2.2 Методика выделения ДНК.....	23
2.3 Проведение ПЦР.....	24
2.4 Методика очистки ампликонов.....	25
2.5 Проведение реакций рестрикции	26
2.6 Проведение электрофореза.....	27
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	29
3.1 Проведение анализа <i>in silico</i>	29
3.2 Выделение ДНК из биомассы бактерий.....	33
3.3 Получение и очистка ампликонов гена 16S-рРНК	34
3.4 Рестриктирование ампликонов 500L – 1350R гена 16S рРНК.....	36
3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных.....	38
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	43

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире практическое значение микроорганизмов трудно переоценить - они применяются в пищевой промышленности и сельском хозяйстве, в медицине и фармакологии, при добыче полезных ископаемых и их переработке, и во многих других сферах жизни человека [1].

Полноценное биологическое исследование с использованием бактерий невозможно без установления их принадлежности к той или иной таксономической группе. Способы идентификации микроорганизмов разрабатывались микробиологами на протяжении долгого времени, и на сегодняшний день многие из них активно используются в науке, медицине и в промышленном производстве.

Известно, что традиционные методы идентификации бактерий с использованием культуральных и морфологических характеристик, а также химических и биохимических реакций имеют ряд недостатков, в частности, невозможность определить видовую принадлежность некультивируемых микроорганизмов. Это определило необходимость применения и совершенствования молекулярно – генетических методов, основанных на изучении и сравнении нуклеотидного состава ДНК. Данные методы отличаются очень высокой специфичностью и чувствительностью, позволяют в короткие сроки идентифицировать микроорганизмы, в том числе некультивируемые (*Mycobacterium leprae*, *Helicobacter pylori*), труднокультивируемые (*Treponema pallidum*) и находящиеся в полимикробных сообществах (микробиота кишечника), по их уникальным нуклеотидным последовательностям в районе определенных генов [2].

Одним из перспективных и широко используемых генетических методов является метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) ДНК [3]. В основе метода анализа ПДРФ лежит использование специфических ферментов – эндонуклеаз рестрикции, способных специфически расщеплять ДНК на строго определённые фрагменты, доступные для

препаративного выделения и анализа *in vitro*. Довольно перспективным для идентификации микроорганизмов оказалось изучение нуклеотидных последовательностей гена, кодирующего 16S рибосомальную РНК [4, 5].

Сегодня более семисот рестриктаз, различных по специфичности и другим физико-химическим свойствам, доступны в виде коммерческих препаратов и регулярно используются в лабораториях для модификации ДНК и решения генно-инженерных задач.

Актуальность работы

Бактерии рода *Arthrobacter* относятся к группе организмов, активно применяемых в различных биотехнологических процессах. Они обладают способностью к разложению многих природных и синтетических соединений, таких как пластмассы, гербициды, фунгициды, инсектициды; являются деструкторами нитрилов, амидов, нефти и нефтепродуктов. Всё это обусловило важность их применения для создания биопрепаратов, используемых в экологических целях [6, 7].

Одним из этапов в организации любого микробиологического производства или исследования является правильная идентификация микроорганизмов. Применение дорогостоящих и достаточно трудоёмких методов, таких как секвенирование ДНК, не всегда является целесообразным и возможным в конкретных условиях лаборатории. Таким образом, актуальной задачей является поиск и оптимизация других, более доступных и, в то же время, эффективных методов.

В настоящее время метод анализа ПДРФ с использованием генетической базы данных секвенированных последовательностей ДНК (GenBank), служит довольно простым способом идентификации бактерий. Данный метод позволяет достаточно скоро получить результаты, и, в то же время, он не так чувствителен к примесям ДНК, как методы секвенирования.

Цель данной работы: используя метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена 16S-рРНК идентифицировать бактерии рода *Arthrobacter* среди образцов почвенных бактерий.

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

- 1) Провести анализ ПДРФ *in silico* ампликонов 500L – 1350R гена 16S-рРНК бактерий рода *Arthrobacter* с использованием данных GenBank для рестриктаз *BstU I*, *BstHI I*, *Hae III*, *MluC I*, *Taq I* и построить теоретические электрофореграммы
- 2) Выделить ДНК из биомассы образцов почвенных бактерий, определить её концентрацию и качество
- 3) С помощью ПЦР получить и очистить ампликоны 500L – 1350R гена 16S рРНК исследуемых бактерий, подвергнуть ампликоны рестрикции с использованием рестриктаз *BstU I*, *BstHI I*, *Hae III*, *MluC I*, *Taq I* и проанализировать полученные продукты с помощью электрофореза в агарозном геле
- 4) Сравнив полученные *in silico* и практически картины электрофоретического разделения рестриктов, определить, какие из исследуемых образцов бактерий являются представителями рода *Arthrobacter*.

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

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Генетический аппарат бактерий

Аналогом ядра у прокариотных организмов является нуклеоид (бактериальная хромосома). В случае *E.coli* – это одна двухнитевая молекула ДНК, которая имеет форму ковалентно замкнутого кольца, занимает определённую область в цитоплазме и не отделена от неё мембраной [8]. Однако у некоторых родов бактерий (как правило, относящихся к типу протеобактерий) в клетке обнаружены «дополнительные» хромосомы. Они меньше по размеру, чем основная, но также содержат жизненно важные для клетки гены. Происхождение этих мини – хромосом в настоящее время точно неизвестно [9].

Пространственная организация ДНК в бактериальной хромосоме осуществляется с помощью специальных нуклеоид - ассоциированных белков, которые, в отличие от гистонов эукариотических ядер, используют другие механизмы для уплотнения ДНК. Эти белки могут быть по-разному распределены в нуклеоиде. Так, установлено, что в клетке *E.coli* четыре из них – HU, Fis, IHF и StpA – разбросаны по всему нуклеоиду, в то время как H-NS образует два компактных кластера. Предполагают, что именно H-NS играет ключевую роль в организации бактериальной хромосомы [10].

Нуклеоид бактериальной клетки не является статическим образованием. Показано, что во время различных фаз роста клетки, нуклеоид постоянно меняет свою форму. Это связано с транскрипционной активностью определённых генов. Большинство бактериальных хромосом имеют молекулярную массу $(1-3) \times 10^9$ Да содержат до 4000 отдельных генов. Каждый ген - это дискретный участок на ДНК, отличающийся числом и специфичностью последовательности нуклеотидов. Гены, в последовательность нуклеотидов которых закодирована информация о последовательности аминокислот в синтезируемых микроорганизмом белках, называются

структурными генами. Транскрипция структурных генов регулируется определёнными регуляторными генами [8, 11].

Кроме нуклеоида, в цитоплазме бактерий иногда встречаются плазмиды - автономные небольшие кольцевые молекулы ДНК, обладающие способностью к независимой репликации. Их число в разных микроорганизмах может варьировать, а длина составляет от нескольких тысяч до сотен тысяч пар оснований. Они не являются обязательной частью генетического аппарата бактерий, но в то же время могут наделять организм весьма важными биологическими свойствами, например, способностью к синтезу токсинов, специфическим иммунитетом к различным антибиотикам и другим химическим препаратам.

В целом, геном прокариот сильно компактизован, содержит минимальное количество некодирующих последовательностей ДНК, гены не несут интронов (кроме архебактерий). Для кодирования белков иногда используются 2 или 3 рамки считывания одной и той же последовательности ДНК, что повышает кодирующие возможности генома без увеличения его размера. Для геномов прокариот характерна variability структуры даже в пределах одного вида. Исходя из внутривидовой динамичности структуры геномов различают консервативный базовый и гибкий вспомогательный наборы генов. Базовый набор состоит из так называемых генов «домашнего хозяйства», ответственных за системы репликации, транскрипции, трансляции, основные пути метаболизма и формирования клеточных структур, определяющих принадлежность микроорганизма к тому или иному виду (роду). К категории вспомогательных входят операционные гены, которые контролируют различные процессы метаболизма и морфофизиологические признаки, обеспечивающие приспособленность к конкретной экологической нише. Многие из этих генов локализованы в мобильных элементах генома, таких как плазмиды, поэтому они не обязательно присутствуют во всех штаммах одного и того же вида бактерий [12, 13].

1.2 Ген 16S рРНК

Прогресс в определении филогении прокариот, а также их идентификации в клинической диагностике был связан с введением рестрикционного анализа амплифицированного гена, кодирующего 16S рибосомальную РНК [14]. Метод начал развиваться в 1980-х годах когда С. Woese с сотрудниками установили, что филогенетические отношения бактерий могут быть определены путём сравнения определённых частей генетического кода [15].

Привлекательность данного гена для решения этих задач определяется рядом особенностей, одна из которых – его универсальность. Ген 16S рРНК, который находится в малой субъединице рибосом прокариот (30S), имеется в геноме всех известных бактерий и архей, но отсутствует у вирусов и в ядерных хромосомах эукариот.

Длина гена 16S рРНК составляет около 1600 нуклеотидов. Он содержит консервативные участки, одинаковые у всех прокариот, а также девять «гипер-вариабельных» областей (V1-V9), которые демонстрируют значительное разнообразие последовательностей среди различных бактерий. Консервативные участки гена могут служить для первого этапа полимеразной цепной реакции — присоединения праймеров к исследуемой ДНК, а видоспецифичные области имеют непосредственно диагностический потенциал. Однако ни одна вариабельная область не является универсальной для дифференцировки всех бактерий, поэтому в настоящее время проводятся систематические исследования с целью выявления относительных преимуществ каждой области для конкретных диагностических целей [5,16].

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК большого количества известных бактерий и архей расшифрованы и доступны в базах генетических данных, таких как, например, NCBI GenBank. Выявленные последовательности сравнивают с имеющимися в базах данных и таким путём идентифицируют микроорганизм.

1.3 Бактерии рода *Arthrobacter*

Род *Arthrobacter* представлен палочковидными грамм-положительными бактериями неправильной формы и варьирующих размеров (0,8–1,2 × 1,0–8,0 мкм), относящимися к семейству *Micrococcaceae*. Это некислоустойчивые, неспорообразующие бактерии, представители некоторых видов подвижны благодаря наличию жгутиков. Характерными аминокислотами клеточной стенки являются лизин или L,L-диаминопимелиновая кислота.

Для артробактерий характерен цикл развития: кокк – палочка – кокк, который для большинства видов завершается в течение 1-2 суток. В молодых культурах палочки имеют неправильную форму, часто V-образные с булавовидными концами. По мере роста культуры палочки распадаются на мелкие кокки диаметром 0,6-1,0 мкм, располагающиеся одиночно, парами и в скоплениях неправильной формы.

Все виды, принадлежащие к данному роду, относятся к группе облигатных аэробов, хемоорганотрофов. Они являются одной из важных групп микроорганизмов, обитающих в различных типах почв. Обладая значительным набором ферментов, артробактерии активно участвуют в круговороте веществ в природе, осуществляя процессы аммонификации и нитрификации, фиксации атмосферного азота и разложения труднодоступных для других микроорганизмов веществ: пластмасс, углеводов, пестицидов, алкалоидов, лигнина и т. д. [17].

Промышленное производство многих хозяйственно ценных веществ, включая пептиды, ферменты, органические кислоты, витамины, основаны на использовании в качестве продуцентов бактерий рода *Arthrobacter*. Так, наряду с представителями родов *Brevibacterium*, *Microbacterium* и *Corynebacterium*, они используются в промышленном производстве L-глутамата [18]. В медицинской промышленности иммобилизованные микробные клетки, например *Arthrobacter globiformis*, широко используют при производстве стероидных гормонов, в частности, для синтеза преднизолона из гидрокортизона [1, 19].

На современном этапе развития науки для радикального повышения продуктивности коммерческих штаммов, определяющего рентабельность микробиологических процессов, всё чаще применяются генетические методы работы с данными штаммами, в частности, широко используются технологии рекомбинантных ДНК и рестрикционный анализ [20]. Некоторые эндонуклеазы рестрикции, например Alu I, AoxI, Asi372I были выделены из представителей рода *Arthrobacter*. В настоящее время работы по поиску новых продуцентов рестриктаз продолжают. Так, недавно была выделена новая эндонуклеаза рестрикции AluVI из *Arthrobacter luteus* В - изошизомер AluI, нечувствительный к присутствию 5-метилцитозина в сайте узнавания AGCT. Подобные открытия очень важны, так как использование изошизомеров, отличающихся по способности гидролизовать модифицированную ДНК, нашло широкое применение при изучении статуса метилирования природных ДНК [21].

Род *Arthrobacter* относится к группе нефтеокисляющих микроорганизмов, что делает его важным объектом экологической микробиологии. Например, известен биопрепарат на основе штаммов *Arthrobacter globiformis* ВКПМ S-1551 и *Rhodococcus crythropolis* ВКПМ S-1550, предназначенный для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов, обладающий высокой окислительной способностью в широком диапазоне температур и pH среды [22]. Также известен штамм *Arthrobacter sp.* МИП-89 ВКПМ 1576 для разложения сырой нефти и нефтепродуктов [23].

Способность некоторых бактерий – деструкторов рода *Arthrobacter* к росту и утилизации полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в условиях повышенной минерализации среды делает их перспективными для использования при биоремедиации почв и стоков с повышенным содержанием солей [24].

1.4 Эндонуклеазы рестрикции

1.4.1 Общая характеристика рестриктаз

Первые рестрикционные эндонуклеазы были выделены в 1968г. из штаммов *E. Coli* В и *E. Coli* К. Сейчас уже выделено более четырёх тысяч этих ферментов.

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) — группа ферментов, относящихся к классу гидролаз и катализирующих гидролиз фосфодиэфирных связей внутри чужеродных молекул ДНК в прокариотических организмах. Рестриктазы — часть сложной системы рестрикции-модификации, используемой бактериями для защиты резидентной ДНК от загрязнения последовательностями чужеродного происхождения. Основными проявлениями специфичности, характерными для всех рестриктаз, являются:

- Узнаваемая последовательность нуклеотидов (сайт рестрикции)
- Место расщепления
- Зависимость действия рестриктаз от характера метилирования оснований в пределах узнаваемой последовательности [4].

Общий механизм действия рестриктаз заключается в следующем: они узнают специфические последовательности из 4-6, реже 8-12 нуклеотидов в двухцепочечной молекуле ДНК (сайты рестрикции) и "разрезают" её в местах локализации этих последовательностей или на некотором расстоянии от них. Количество образующихся рестрикционных фрагментов ДНК при использовании одной рестриктазы зависит от количества сайтов рестрикции, а размер фрагментов определяется положением мест «разрезов» по всей длине исходной молекулы ДНК [4, 25].

Таким образом, использование определённого набора данных ферментов позволяет получить фрагменты ДНК желаемой длины для дальнейших исследований, а также составить карту сайтов рестрикции, что определяет исключительную значимость рестриктаз как аналитических реагентов.

1.4.2 Классификация

По механизму действия и молекулярной структуре рестриктазы разделены на 3 основных типа:

- **Рестриктазы I типа** узнают определённую последовательность нуклеотидов и разрезают ДНК неподалёку от этой последовательности в произвольной точке и само место разреза не строго специально.
- **Рестриктазы II типа** узнают определённую последовательность из 4-6 и более нуклеотидов, и разрезают ДНК в фиксированной точке внутри этой последовательности. Рестриктазы этого типа, в основном, узнают палиндромальные последовательности.
- **Рестриктазы III промежуточного типа** узнают нужную последовательность и разрезают ДНК, отступив определённое число нуклеотидных пар от её конца (или в нескольких точках на разном удалении от сайта узнавания). Эти рестриктазы узнают асимметричные сайты [26].

Ферменты типов I и III имеют сложную субъединичную структуру и обладают двумя типами активностей - модифицирующей (метилирующей) и АТФ-зависимой эндонуклеазной. Комплексы II типа состоят из 2 отдельных белков: рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы. Они нуждаются в ионах магния в качестве кофакторов [4].

Также рестриктазы делят на мелко- и крупнощепящие. Мелкощепящие рестриктазы (пример: Hpa II, Alu) узнают тетра-нуклеотид и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупнощепящие (пример: Eco R I, Hind III), узнающие последовательность из шести - восьми нуклеотидных пар.

При действии ферментов рестрикции могут образовываться фрагменты ДНК двух типов: с ровными (тупыми) концами, либо с выступающими (липкими) 5'-или 3'-концами. Возможность получения фрагментов с «липкими» концами

сделала многие рестриктазы основным инструментом генной инженерии для получения *in vitro* химерных молекул ДНК [27].

1.4.3 Основные сферы применения рестриктаз

Рестриктазы нашли широкое применение в биотехнологии и генной инженерии для получения *in vitro* гибридных молекул ДНК. Один из наиболее простых и популярных методов – рестриктазно – лигазный. В этом методе используются рестриктазы II типа. «Липкие» концы фрагментов различных молекул ДНК, гидролизованных одной и той же рестриктазой, ассоциируют за счёт комплиментарного взаимодействия; с помощью ДНК – лигазы происходит ковалентное связывание ассоциированных фрагментов. Далее специфические молекулы – векторы обеспечивают встраивание гибридной молекулы в генетические системы различных организмов и её воспроизведение [27].

Анализ полиморфизма генов играет важную роль в оценке предрасположенности к инфекционным и другим видам заболеваний на популяционном и индивидуальном уровне. Так, методом ПДРФ была выявлена связь полиморфизма генов аполипопротеина E и супероксиддисмутаза 2-го типа с развитием хронического вирусного гепатита C и процессом фиброгенеза [28]. На основе анализа ПДРФ малазийские учёные выяснили, что полиморфизм в нуклеотидных последовательностях генов EGF 5'-UTR и NAT2 ассоциирован с повышением риска развития глиомы [29]. Рестриктаза BstHI также использовалась для выявления взаимосвязи однонуклеотидного полиморфизма гена FABP2 с риском развития ожирения и с предрасположенностью человека к занятиям спортом [30].

Ещё одна сфера применения рестрикционного анализа – генетическая идентификация организмов и установление родства в генетических лабораториях [31]. Очень важное значение имеет идентификация патогенных микроорганизмов в клинических лабораториях, а также бактерий - биодеструкторов и бактерий-продуцентов ферментов [32-35].

Рестрикционный анализ может быть проведён с использованием одной рестриктазы, но чаще необходимость различить близкородственные виды требует применения нескольких ферментов рестрикции. Например, в ходе одного из исследований было установлено, что комбинация эндонуклеаз рестрикции Hae III, Pst I и Hind III для определения вирулентности *Blastocystis* spp. может служить достаточно простым и универсальным способом идентификации простейших в зависимости от степени выраженности вирулентных свойств [36].

Использование нескольких эндонуклеаз рестрикции на одном образце дало возможность составлять рестрикционные карты. Сравнение рестрикционных карт для двух или более родственных генов позволяет оценить гомологию между ними, так как рестрикционная карта отражает расположение определенной последовательности нуклеотидов в данном участке. Причем сравнение определенных участков ДНК разных видов животных возможно без определения их нуклеотидной последовательности. Так, например, при исследовании хромосомных участков, кодирующих цепи гемоглобина у человека, орангутанга и шимпанзе, была установлена их высокая консервативность: данные участки сохранились в практически неизменном виде в течение последних 5 - 10 млн. лет [37].

1.4.4 Особенности работы с эндонуклеазами рестрикции

При постановке реакции рестрикции ДНК необходимо учитывать несколько основных факторов. Для каждого фермента рестрикции существуют оптимальные условия реакции, которые приводятся в описании, прилагаемом фирмой-изготовителем. Основные переменные параметры – это температура инкубации и состав буфера. При проведении реакции в нестандартных условиях некоторые рестриктазы могут проявлять неспецифическую активность, что негативно отражается на результатах исследования.

Наилучшей рестрикции будет способствовать использование рекомендуемых количеств ДНК, фермента и буферных компонентов. Одна единица активности

рестриктазы полностью расщепляет 1 мкг субстрата ДНК в 50 мкл реакционной смеси за 60 минут. Это соотношение фермент/ДНК/объем реакционной смеси должно служить ориентиром при планировании реакции рестрикции.

Часто бывает необходимо проводить гидролиз одной и той же ДНК двумя различными ферментами одновременно. Для этого производитель предоставляет информацию об относительной активности каждого фермента в различных буферах (в процентах от активности в оптимальном буфере). Пользуясь этими данными можно выбрать буфер, в котором активность обоих ферментов не менее 50%, и использовать его для совместного гидролиза [38].

1.5 Полимеразная цепная реакция

Бурный прогресс в области молекулярной биологии в конце XX века сопровождался возникновением принципиально новых методов исследования, в особенности — полимеразной цепной реакции (ПЦР). Термостабильную ДНК-полимеразу, необходимую для реакции ПЦР, впервые выделили и исследовали советские ученые А.С. Каледин, А.Г. Слюсаренко и С.И. Городецкий в 1980 году [39].

В основе любой ПЦР лежит процесс многократного копирования (амплификации) *in vitro* определённого фрагмента молекулы ДНК, осуществляемый с помощью фермента ДНК-полимеразы. В простейшем случае для проведения ПЦР нужны следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- два праймера (затравки, необходимые для инициации синтеза ДНК) – это олигонуклеотиды, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК
- термостабильная ДНК-полимераза (например, Taq – полимеразы) – фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК
- дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы

- буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — рН, ионную силу раствора [26].

ПЦР представляет собой циклический процесс (обычно 20-35 последовательно повторяющихся циклов), каждый из которых включает три этапа, протекающих в различных температурных режимах:

- 1-й этап: денатурация ДНК (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК) протекает при 95–99 °С.
- 2-й этап: присоединение (отжиг) праймеров к матричной ДНК. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 50-65°С. Обычно температура устанавливается на 5-6 °С ниже температуры плавления праймеров.
- 3-й этап: элонгация – «достраивание» цепей ДНК по имеющимся участкам генов, начиная с точек присоединения праймеров. Данный этап идет с участием фермента ДНК-полимеразы при температуре 70–72°С.

Полимеразную цепную реакцию проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок с реакционной смесью, в результате чего происходит смена этапов каждого цикла. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта». Многие приборы производят с подогревающейся крышкой, чтобы избежать испарения реакционной смеси [39,40].

Сейчас разработано множество вариантов проведения полимеразной цепной реакции. Постоянное совершенствование технологий обеспечивает широкое использование данного метода в науке и медицинских исследованиях, криминалистике, системах санитарно-эпидемиологического контроля и других отраслях.

1.6 Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Как уже было отмечено, рестриктазы являются высокоспецифичными ферментами, способными узнавать строго определённые участки (сайты рестрикции) генов. Однако различные изменения последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК могут приводить к резистентности сайта рестрикции или, наоборот, к возникновению новых участков, чувствительных к рестриктазе. Причины такой variability в структуре генов: точечные мутации в виде единичных нуклеотидных замен; делеции и инсерции более крупных участков протяжённостью от одного до сотен или тысяч нуклеотидов; ошибки при репликации ДНК; транслокации или транспозиции мобильных генетических элементов и т. п. В результате соответствующие фрагменты ДНК, полученной от двух генетически не идентичных особей, часто образуют рестрикционные фрагменты различной длины. Это явление носит название полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) ДНК [41, 42].

Метод анализа ПДРФ включает несколько стадий:

- 1) ПЦР - амплификация определённого фрагмента гена, который характеризуется наличием переменных участков
- 2) обработка амплифицированных фрагментов соответствующей эндонуклеазой
- 3) разделение продуктов рестрикции, различающихся по размеру, с помощью гель - электрофореза и анализ результатов.

В настоящее время метод анализа ПДРФ получил широкое распространение ввиду своей простоты и надёжности, гибкости и относительно низкой себестоимости. Это важнейший инструмент в картировании генома, выявлении локализации генов, ответственных за генетические заболевания, определения риска заболевания, получения генетических отпечатков и определения родства [43].

1.7 Электрофорез ДНК

Электрофорез – это метод пространственного разделения макромолекул, основанный на разной скорости их перемещения в электрическом поле. Данный метод позволяет разделять органические молекулы (например, белки, нуклеиновые кислоты), отличающиеся по таким параметрам, как молекулярная масса, пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд.

Благодаря своей исключительной гибкости электрофорез нашёл широкое применение в исследовательских и клинических целях. Например, в случае геля - электрофореза можно проводить электрофорез в гелях с очень широким диапазоном размеров пор, варьируя концентрацию полимера. Также можно изменять электрические заряды макромолекул путем вариации рН буфера, а их конфигурацию путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов [44].

Для электрофоретического разделения нуклеиновых кислот проводят электрофорез в гелях. Этот метод позволяет определить длину и однородность молекул ДНК, а также разделить и выделить нужные фрагменты. Чаще всего используют полиакриламидный (ПААГ) и агарозный гель, так как они обладают свойствами молекулярного сита.

Удобство применения агарозного геля определяется следующими его особенностями:

- Крупнопористость, что позволяет разделить большие молекулы ДНК;
- простота приготовления;
- нетоксичность;
- возможность восстановления образцов из геля для дальнейших исследований.

Нуклеиновые кислоты обладают значительным по величине отрицательным зарядом, поэтому под действием электрического поля они

мигрируют в геле к аноду (положительный заряд). Скорость миграции ДНК через агарозный гель определяется следующими параметрами:

- Размерами и концентрацией ДНК (малые молекулы мигрируют в геле быстрее, чем крупные)
- концентрацией агарозы (для электрофореза применяют агарозные гели с концентрацией 0,3 - 3%)
- напряжённостью электрического поля (1 – 8 В/см)
- используемым буфером (буферы TAE, TBE, TPE) [45].

Рассмотрим более подробно компоненты, используемые для проведения электрофореза в агарозном геле:

Агароза. Получаемый из агара морских водорослей линейный полисахарид, обладающий ярко выраженным свойством к образованию гелей. Агарозные гели имеют «поры» достаточно большого размера и используются преимущественно для разделения крупных молекул с молекулярной массой больше, чем 200 кДа.

Фрагмент ДНК заданного размера перемещается в геле на различные расстояния в зависимости от концентрации агарозы, так как она определяет плотность геля. Разделение происходит достаточно быстро, но с ограниченным разрешением, так как полосы, образующиеся в агарозных гелях, имеют тенденцию размываться/диффундировать.

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 и дают остыть, чтобы сформировался прочный гель. Точка плавления агарозы— 95 °С, точка образования геля — 45 °С.

Буфер для электрофореза. Состав и ионная сила буфера для электрофореза воздействуют на электрофоретическую подвижность ДНК. В буфере с высокой ионной силой электропроводность очень эффективна, и

образуется значительное количество тепла. Бывает, гель расплавляется и ДНК денатурирует.

Существует несколько буферов для электрофореза двухцепочечной ДНК. Они содержат EDTA (pH 8.0) и Tris-ацетат (ТАЕ) или Tris-борат (ТВЕ) в концентрации приблизительно 50 мМ (pH 7.5 - 7.8). Буферы для электрофореза обычно готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре.

По сравнению с ТВЕ, в буфере ТАЕ линейная ДНК обладает большей подвижностью, а суперспиральная форма несколько лучше разделяется. Однако по своей буферной ёмкости ТАЕ значительно уступает ТВЕ, и по этой причине ТАЕ не годится для длительных форефов и экспериментов, требующих высоких напряжений.

Буфер для нанесения проб. Образцы ДНК, которые будут наноситься на агарозный гель, сначала смешивают с буфером для нанесения. Для того, чтобы проба не вытекла за пределы лунки и располагалась в ней наиболее компактно, она должна иметь большую плотность, чем электрофорезный буфер. Для «утяжеления» пробы в состав буфера для нанесения включают глицерин или сахарозу.

Также буфер для нанесения проб содержит специально подобранный краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые молекулы, но не взаимодействуют с ними. Присутствие красителя облегчает внесение образцов в лунки и позволяет в режиме реального времени наблюдать продвижение в геле фрагментов ДНК. В качестве красителей используют: бромфеноловый синий, ксиленцианол, крезоловый красный или OrangeG. Для каждой концентрации агарозного геля подбирается определенный краситель и его концентрация для оптимальных условий проведения электрофореза.

ДНК маркеры. При заданных напряжении, концентрации агарозного геля и буфере, расстояние перемещения в единицу времени зависит от молекулярной массы исходного материала. Поэтому маркерная ДНК известного размера должна наноситься на дорожки и с левого, и с правого края геля. Такое нанесение также позволяет контролировать идентичность условий в разных частях геля. Чаще всего в качестве маркера используются фрагменты ДНК, полученные после обработки известной плазмиды различными сайт-специфичными рестриктазами. В этом случае на дорожке наблюдается набор полос, каждая из которых соответствует фрагменту ДНК строго определённого размера. Это также облегчает определение размера исследуемой ДНК.

Наилучшего разделения ДНК удаётся добиться при напряжённости электрического поля порядка 5 В/см в режиме стабилизации по напряжению. Не рекомендуется превышать значение напряжённости в 10 В/см, т.к. это может привести к искажению полос, преждевременному истощению буфера и перегреву геля [26, 46].

Разделившиеся зоны биополимеров во избежание их диффузии немедленно фиксируют, а также окрашивают бромистым этидием для визуализации электрофоретической картины в ультрафиолетовом свете. Бромистый этидий относится к соединениям, способным интеркалировать между парами оснований ДНК. Для того, чтобы избавиться от фоновой флюоресценции несвязавшегося бромистого этидия, после окрашивания гель отмывают в воде.

Следует отметить, что обычные варианты гель – электрофореза не позволяют разделить фрагменты ДНК, размер которых превышает 20 т.п.н. Для применения метода анализа ПДРФ обычно применяют мелкощепящие рестриктазы второго типа, имеющие сайт узнавания из четырёх нуклеотидов. Однако в некоторых исследованиях возникает необходимость использовать редкощепящие рестриктазы, гидролизующие ДНК с образованием очень крупных фрагментов размером порядка 20 – 10000 т.п.н. Чтобы разделить такие

огромные фрагменты, используется модифицированный метод - гель-электрофорез с пульсирующим полем (PFGE) [45].

1.8 Генетический анализ *in silico*

Компьютерное моделирование молекулярно-генетических и биохимических процессов является самым молодым и перспективным направлением в развитии естественно-научных дисциплин. Для обозначения компьютерного моделирования эксперимента (чаще биологического), в 90-е годы XX века был введён термин *in silico*, который дополнил ряд уже имеющихся классических определений характера экспериментальной среды — *in vivo* («вживую», т.е. непосредственно в биологической системе) и *in vitro* («в пробирке», т.е. в искусственной среде) [47].

Необходимость использования компьютерных технологий при проведении исследований обусловлена колоссальной сложностью и огромным объемом молекулярно-генетических данных. В настоящее время существует множество специализированных баз данных, в которых вся имеющаяся информация систематизирована и находится в открытом доступе. Это позволяет учёным анализировать различные геномы, имеющие длину до нескольких миллиардов пар нуклеотидов за короткое время, осуществлять поиск нужных последовательностей ДНК, РНК, белков и работать с ними.

С помощью компьютерного моделирования анализируют нуклеотидные и аминокислотные последовательности, производят их выравнивание, поиск гомологичных участков последовательностей нуклеиновых кислот и белков разных организмов, построение филогенетических карт [48].

Применение биоинформационного метода позволяет заранее планировать и моделировать эксперимент, осуществляя теоретически амплификацию, рестрикционный анализ, электрофорез. При таком подходе снижается вероятность ошибок в ходе проведения эксперимента на практике, что позволяет значительно повысить качество работы при минимальных затратах.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

В качестве объекта исследования использовались 12 образцов биомассы почвенных бактерий, любезно предоставленных Ларьковой Анной Николаевной, магистром базовой кафедры биотехнологии СФУ.

2.2 Методика выделения ДНК

Выделение бактериальной геномной ДНК проводили с помощью набора реагентов SILICA uni компании «Биоком» (Москва, Россия). Данная методика основана на сорбции преимущественно высокомолекулярной фракции нуклеиновых кислот суспендированными частицами оксида кремния, что позволяет производить пробоподготовку с минимальными потерями, и обуславливает высокое качество полученного препарата ДНК.

Первым шагом выделения бактериальной ДНК является суспендирование биомассы бактерий в специальном лизирующем растворе, основным компонентом которого является гуанидинтиоцианат. После инкубации (5 мин, 65°C) и центрифугирования (7 мин, 10 тыс. об./мин) в осадке остаются крупные внутриклеточные органеллы, обломки клеток и полуразрушенные бактерии, ДНК остается в супернатанте.

К отобранному супернатанту, содержащему ДНК, добавляли суспензию сорбента. После того, как ДНК адсорбируется на суспендированных частицах оксида кремния и последующего центрифугирования, осадочную смесь промывали один раз отмывочным раствором 1, затем два раза отмывочным раствором 2. Это делается для очистки адсорбированной ДНК от нежелательных органических молекул и солей. После каждой промывки пробы центрифугировали (30 сек при 2 тыс. об./мин). Осадок помещали в термостат, затем к высушенному осадку добавляли элюирующий раствор, выдерживали 30 минут при 65°C и центрифугировали (1 мин, 10 тыс. об./мин). Надосадочная жидкость – это готовый препарат бактериальной ДНК.

Концентрацию и чистоту полученной ДНК измеряли на спектрофотометре Bio-Rad SmartSpec™Plus Spectrophotometer.

2.3 Проведение ПЦР

Исследуемую ДНК (2 мкл концентрации 2 нм/мкл) (предварительно размороженную и отцентрифугированную - 12000 об./мин, 1 мин) помещали в ПЦР - пробирки объемом 0,2 мл, уже содержащие необходимые компоненты (n – количество образцов плюс один на каждые 10 образцов):

- Стерильная дистиллированная вода - 36 мкл x n
- 10x буфер (20 mM Tris-HCl (pH 8,8 при 25⁰C), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100) - 5 мкл x n
- Праймеры 1350R и 500L (в концентрациях по 5μM) - 3 мкл x n
- Смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (в концентрациях по 2,5мM) - 5 мкл x n.

Реакционную смесь (перемешанную и отцентрифугированную -12000 об./мин, 30 с) помещали на лед. Далее пробирки помещаются в амплификатор Bio-Rad - MJ Mini Personal Thermal Cycler с заданной программой амплификации:

95°C – 2 мин;

80°C – 0:30 мин;

95°C – 0:20 сек;

64°C – 0:20 сек;

72°C - 3:00 мин;

GO TO 3 30 times;

72°C – 5:00;

4°C – 18:00:00 ч;

END.

Тақ-полимераза ((1 ед./мкл, Сибэнзим) - 1 мкл) однократно добавлялась в первом цикле на втором шаге после снижения температуры до 80⁰C

непосредственно в ходе амплификации (конечная концентрация фермента в реакционной смеси 0,02 ед./мкл), на паузе.

Данный фермент выделен из штамма *E.coli*, несущего ген *Taq* ДНК-полимеразы термостабильной бактерии *Thermus aquaticus*. Высокоочищенная *Taq*-полимераза обеспечивает высокий выход амплифицированной ДНК с разнообразных ДНК-матриц, включая геномную ДНК. В оптимальных условиях длина амплифицированного фрагмента может достигать 5 т.п.о.

Для получения ампликонов нами были использованы праймеры 500L и 1350R (нуклеотидный состав 5'-CGTGCCAGCAGCCGCGGТАА-3' и 5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3' соответственно), синтезированные компанией Синтол (Москва, Россия). *Taq*-полимераза и 10-кратный буфер к ней, а также смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов были приобретены у производителя НПО «СибЭнзим».

2.4 Методика очистки ампликонов

Очистка ампликонов производилась с помощью набора PureLink PCR Purification Kit, производство фирмы Invitrogen.

Метод очистки ампликонов с использованием набора реагентов PureLink PCR Purification Kit основан на селективном связывании ДНК с мембраной на основе диоксида кремния в присутствии хаотропных солей. К раствору ДНК добавляли связывающий буфер (Binding Buffer), в соотношении 4:1 и получившуюся смесь перемешивали. Данную смесь наносили на колонку для сорбции ДНК, после чего добавляли промывочный буфер (Wash Buffer), содержащий этанол. Таким образом, ДНК полностью очищается от сопутствующих примесей: избытка праймеров, праймеров-димеров, dNTP, солей. Финальным шагом было элюирование ДНК с колонки с помощью специального буфера (Elution Buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.5).

Общее время очистки ампликонов составило 25-35 мин. Очищенную таким методом ДНК ампликонов использовали для рестрикционного анализа.

После проведения амплификации и очистки ампликонов для контроля успешности проводили электрофорез в 1% агарозном геле в TAE буфере с ДНК-маркером 100 п.о. НПО «СибЭнзим».

2.5 Проведение реакций рестрикции

Реакцию проводили в 50 мкл реакционной смеси. При постановке реакции рестрикции для 12 проб сначала была приготовлена смесь с запасом на 13 образцов для каждой рестриктазы. Состав общей смеси:

- 364 мкл дистиллированной воды
- 65 мкл 10x буфера (для каждой рестриктазы свой буфер)
- 65 мкл BSA (10 мкг/мл)
- 26 мкл фермента рестриктазы

В отдельные 12 пробирок было добавлено по 40 мкл из общей смеси и 10 мкл ДНК ампликонов исследуемых образцов бактерий. Время реакции рестрикции - 2 часа. Температура для каждой рестриктазы выставлялась индивидуально: 37⁰ (рестриктазы *Hae III*, *MluC I*), 50⁰ (рестриктаза *BstHI I*), 65⁰ (рестриктазы *BstU I* и *Taq I*).

Все использованные рестриктазы имеют тетра nukлеотидные сайты узнавания, что позволяло получить от 2 до 8 фрагментов ДНК в результате расщепления продукта амплификации, имеющего длину порядка 890 п.о.

Рестрикцию проводили в пробирках «Eppendorf» на 0,5 мл в приборе ThermoMix Plus фирмы «Eppendorf» Для визуализации результатов рестрикции продукты реакции подвергались электрофорезу в агарозном геле и последующей гель-документации.

2.6 Проведение электрофореза

Необходимое оборудование для проведения электрофореза:

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

Используемые реактивы:

- 0,85г порошка агарозы
- 50мл электрофорезного буфера TAE
- ДНК - маркеры (100bp)
- 6 x буфер для нанесения пробы (ксиленцианол FF, метиленовый синий, глицерин и вода)
- Дистиллированная вода
- Образцы ДНК микроорганизмов

Ход работы:

- 1) Добавили порошок агарозы в буфер для электрофореза.
- 2) Полученную смесь нагревали в микроволновой печи до тех пор, пока агароза не образовала равномерную суспензию. Суспензию довели до начала кипения, затем осторожно удалили из микроволновой печи и охладили до 60⁰С.
- 3) Установили форму для заливки агарозы по уровню, установили гребенку
- 4) Залили охлаждённую до 60⁰С суспензию в форму для агарозы: необходимо, чтобы между дном лунки от гребенки и основанием геля оставался слой агарозы толщиной 0,5-1,0 мм, т.е. чтобы дном лунки служил агарозный гель. Оставили гель застывать на 30 мин.
- 5) После того, как гель полностью затвердел, удалили гребенку и поместили гель в электрофорезную камеру; добавили достаточное количество

электрофорезного буфера, так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1 мм.

- 6) Смешали пробы ДНК и маркёры с буфером для нанесения в соотношении 3:7 (буфер для нанесения содержит глицерин и отрицательно заряженные молекулы красителя) в отдельном планшете; с помощью автоматической микропипетки внесли смесь в лунки геля под электрофорезный буфер ТАЕ.
- 7) Подсоединили электроды к источнику напряжения. Напряжение при проведении электрофореза составило 60V, время - 3 ч.
- 8) По окончании разделения вынули подложку с гелем из кюветы и поместили гель вместе с подложкой в красящий раствор (1 мкг/мл бромистого этидия). После 20 мин окрашивания вынули подложку вместе с гелем и промыли в воде в течение 2 мин.
- 9) Поместили гель в камеру трансиллюминатора гель - документирующей системы, проанализировали и задокументировали гель в проходящем ультрафиолетовом свете.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Проведение анализа *in silico*

Из базы данных GenBank были выбраны нуклеотидные последовательности гена 16S-рРНК различных штаммов бактерий рода *Arthrobacter* [49]. Затем был проведен рестрикционный анализ *in silico* ампликонов 500L-1350R этих генов с помощью программы pDRAW32 - Freeware DNA cloning, analysis and visualization software [50]. Для рестрикционного анализа были взяты рестриктазы *Bst*HI I, *Bst*U I, *Hae* III, *Mlu*C I и *Taq* I.

Ниже представлен пример виртуального рестрикционного анализа для штамма *Arthrobacter globiformis* NBRC 12137.

Нуклеотидная последовательность ампликона 500L-1350R гена 16S рРНК *Arthrobacter globiformis* NBRC 12137:

```
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCTGCCGTGAAAGTCC
GGGGCTCAACTCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGATGTA
GGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAG
GAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCATTAACTGACGCTGAGGAG
CGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGT
AAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCACGTTTTTCCGCGCCGTAG
СТААСGCАТТААГТGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAАСТ
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATT
CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGGACCGGACCGCCG
CAGAAATGTGGTTTTCTCSTTTTGGGGCCGGTTCACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTТААГТСССGCAACGAGCGCA
ACCCTCGTTCCATGTTGCCAGCACGTAGTGGTGGGGACTCATGGGAGACT
GCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCS
СТТАТGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGC
GATACTGTGAGGTGGAGСТААТСССAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTG
GGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGТААТCGCAGATC
AGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
```

Результаты виртуального рестрикционного анализа для штамма *Arthrobacter globiformis* NBRC 12137 (рис. 1):

```
New DNA entry, 899 bp. (LINEAR)
Restriction analysis 27.04.2017
pDRAW32 revision 1.1.132
UNLICENSED
Rebase containing 277 enzymes.
5 enzymes match enzyme selection criteria.

*****

BstUI (CG'CG) [AccII,Bsh1236I,BspFNI,BstFNI,MvnI]
Cuts 4 times.
Cuts at positions 14, 82, 342, 460.
Fragment sizes 14, 68, 260, 118, 439.

HaeIII (GG'CC) [BshFI,BsnI,BsuRI]
Cuts 5 times.
Cuts at positions 384, 418, 526, 733, 879.
Fragment sizes 384, 34, 108, 207, 146, 20.

HhaI (G_CG'C) [AspLEI,BstHHI,CfoI,Hin6I,HinP1I,HspAI]
Cuts 4 times.
Cuts at positions 31, 187, 344, 598.
Fragment sizes 31, 156, 157, 254, 301.

MluCI ('AATT_) [Sse9I,TasI]
Cuts 4 times.
Cuts at positions 45, 161, 406, 446.
Fragment sizes 45, 116, 245, 40, 453.

TaqI (T'CG_A)
[dam methylated]
Cuts 2 times.
Cuts at positions 450, 812.
Fragment sizes 450, 362, 87.
```

Рисунок 1 - Виртуальный рестрикционный анализ ампликона 500L-1350R гена 16S рПНК *Arthrobacter globiformis* NBRC 12137 рестриктазами *BstU I*, *Hae III*, *BstHH I* (*Hha I*), *MluC I*, *Taq I*

Как видно из представленных выше данных, в частности, рестриктаза *BstU I* разрезает ампликон в положениях 14, 82, 342 и 460 с образованием фрагментов размером 14, 68, 260, 118 и 439 пар оснований.

По результатам виртуального рестрикционного анализа была составлена теоретическая картина электрофоретического распределения рестриктов ампликона 500L – 1350R гена 16S рПНК *Arthrobacter globiformis* NBRC 12137 (рис. 2).

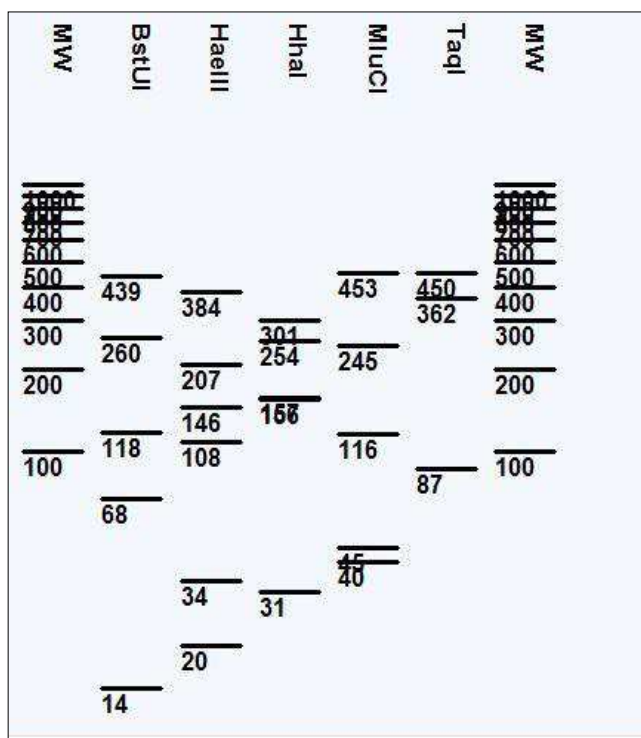


Рисунок 2 – Теоретическая картина электрофоретического распределения рестрикетов ампликона 500L – 1350R гена 16S рРНК *Arthrobacter globiformis* NBRC 12137

Таким же образом был проведён виртуальный рестрикционный анализ ещё около двух десятков ампликонов 500L-1350R генов 16S рРНК различных штаммов бактерий рода *Arthrobacter*. Ниже приведены результаты виртуального рестрикционного анализа, сведённые в таблицу, для шести из исследованных штаммов бактерий рода *Arthrobacter* (Таблица 1). Данные для остальных исследованных штаммов бактерий рода *Arthrobacter* показали схожие величины.

Таблица 1 - Размеры рестриктов ампликонов 500L – 1350R, полученные после проведения теоретического рестриктирования (пар оснований)

Рестриктазы Штаммы бактерий рода <i>Arthrobacter</i>	<i>Bst</i> HH I	<i>Bst</i> U I	<i>Hae</i> III	<i>Mlu</i> C I	<i>Taq</i> I
<i>Arthrobacter sp. Leaf141</i>	301 253 157 156 31	438 260 118 68 14	384 207 146 107 34 20	452 245 116 45 40	450 361 87
<i>Arthrobacter globiformis strain BGSm404</i>	301 250 157 156 31	436 260 116 68 14	384 203 146 103 32 20	448 244 116 45 39	448 353 87
<i>Arthrobacter globiformis strain DSM 20124</i>	300 254 157 157 31	438 260 118 69 14	385 206 146 108 34 20	452 245 116 46 40	451 361 87
<i>Arthrobacter psychrolactophilus strain D2</i>	300 254 157 157 31	438 260 118 69 14	385 206 146 108 34 20	452 245 116 46 40	451 361 87
<i>Arthrobacter globiformis NBRC 12137</i>	301 254 157 156 31	439 260 118 68 14	384 207 146 108 34 20	453 245 116 45 40	450 362 87
<i>Arthrobacter arilaitensis strain KLBMP5180</i>	301 254 157 157 30	436 260 116 68 14	284 207 146 107 32 20	452 245 116 45 40	450 361 87

Как видно из результатов, приведенных в таблице, применение использованных эндонуклеаз рестрикции вполне пригодно для идентификации бактерий рода *Arthrobacter*, так как все проанализированные штаммы имеют близкие рестрикционные профили по каждой конкретной рестриктазе (одинаковое количество фрагментов, различия в размерах фрагментов сходных длин не более 1-6 нуклеотидов).

После проведения анализа *in silico* провели экспериментальный анализ.

3.2 Выделение ДНК из биомассы бактерий

Из 12 образцов бактерий была выделена суммарная ДНК, затем спектрофотометрически определены её концентрация и качество (Таблица 2). Сделан вывод, что все образцы ДНК высокого качества и пригодны для дальнейших исследований, так как отношение A_{260}/A_{280} у этих образцов входит в оптимальный диапазон значений от 1,8 до 2,0.

Таблица 2 - Концентрация и чистота полученной ДНК

№ Пробы	Концентрация ДНК (мкг/мл)	Чистота препарата
		A_{260} / A_{280}
1	48	1,84
2	35	1,89
3	44	1,86
4	37	1,90
5	32	1,93
6	44	1,87
7	40	1,80
8	41	1,95
9	38	1,97
10	45	1,81
11	39	1,98
12	47	1,86

После выделения ДНК был проведён электрофорез полученных фрагментов ДНК в агарозном геле, по результатам которого определили средние размеры выделенной геномной ДНК - более 10 тыс. п.о., что соответствует ожидаемым результатам для используемого метода выделения.

Ниже представлена электрофореграмма выделенной ДНК из 6 исследуемых образцов бактерий (рис.3). Результаты для остальных образцов бактерий имели сходную картину электрофореза.

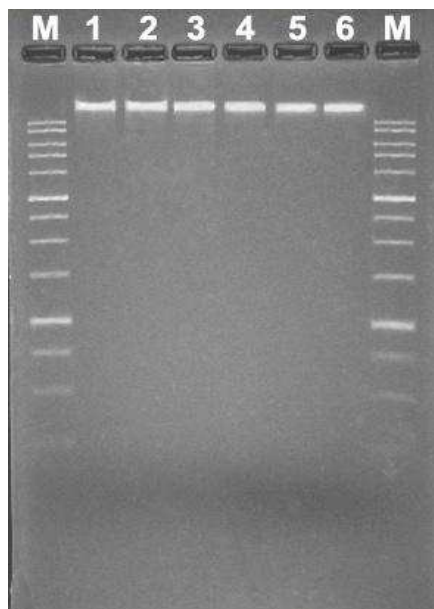


Рисунок 3 - Суммарная геномная ДНК бактерий

М – Маркер 1kb

1– 6 – Исследуемые образцы бактерий 1-6

3.3 Получение и очистка ампликонов гена 16S-рРНК

С использованием выделенных образцов ДНК были получены ампликоны – копии участков гена 16S рРНК, ограниченные последовательностями, комплементарными паре праймеров 500L-1350R. Затем ампликоны были подвергнуты очистке с использованием набора PureLink PCR Purification Kit от праймеров, dNTP и фермента. Далее спектрофотометрически были определены концентрация и качество ДНК ампликонов. Все очищенные образцы ампликонов оказались пригодны для дальнейшей работы, так как отношение поглощений A_{260}/A_{280} у них входило в оптимальный диапазон 1,8 - 2,0 (Таблица 3).

Таблица 3 - Концентрации и чистота полученных ампликонов

№ Пробы	Концентрация, мкг/мл	Чистота препарата A_{260} / A_{280}
1	26	1,91
2	25	1,82
3	29	1,84
4	33	1,90
5	37	1,90
6	30	1,89
7	26	1,84
8	35	1,91
9	28	1,82
10	33	1,93
11	37	1,83
12	28	1,88

После проведения амплификации для контроля успешности ПЦР также был проведён электрофорез в агарозном геле. Результаты электрофореза показали наличие ожидаемых ампликонов гена 16 S рРНК размером около 900 п.о. в амплификанте (содержимом реакционной среды после проведения ПЦР). Ниже представлена электрофореграмма для 6 исследуемых образцов бактерий (рис. 4). Образцы остальных бактерий показали сходную электрофоретическую картину.

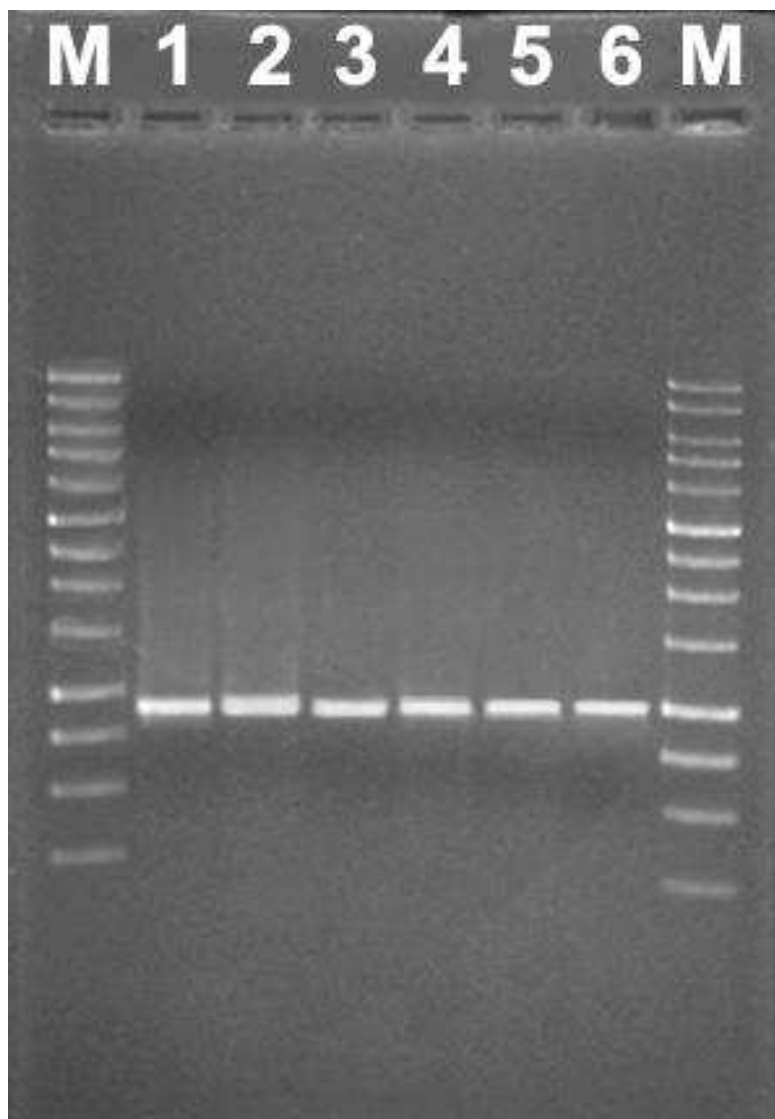


Рисунок 4 – Ампликоны 500L– 1350R гена 16S-рРНК бактерий

М – Маркер 1 kb

1– 6 – Исследуемые образцы бактерий 1- 6

3.4 Рестриктирование ампликонов 500L – 1350R гена 16S рРНК

Ампликоны, полученные с помощью ПЦР, были прорестриктированы с использованием эндонуклеаз рестрикции: *BstHNI*, *BstU I*, *Hae III*, *MluC I* и *TaqI*.

После проведения экспериментального электрофореза и документирования результатов, сравнив положение рестриктов с маркерами, для каждого образца исследуемых бактерий определили приблизительные размеры полученных рестриктов (Таблица 4).

Таблица 4 – Примерные размеры рестриктов по данным полученных электрофореграмм (пар оснований)

Рестриктазы Образцы бактерий	<i>Bst</i> HH I	<i>Bst</i> U I	<i>Hae</i> III	<i>Mlu</i> C I	<i>Taq</i> I
1	300 250 190 160	440 260 120 70	380 310 150 30	450 240 110 50	450 320 90 40
2	340 300 200 60	300 200 180 90 70	450 380	450 240 110 40	450 440
3	600 300	430 380	460 410	450 240 110 40	450 360 80
4	290 270 250 70	290 170 160 100 90 40	360 320 200	440 240 110 40	450 360 90
5	300 250 160	440 260 110 60	380 200 150 100	450 240 110 50	450 360 90
6	200 280 140 110 60	440	410 180 170 110	450 240 110 50	450 310 90 50
7	290 270 250 70	290 170 160 100 90 40	360 320 200	440 240 110 40	450 360 90
8	300 250 190 160	440 260 120 70	380 310 150 30	450 240 110 50	450 320 90
9	300 250 160 160	440 260 110 60	380 200 150 100	450 240 110 50	450 360 90
10	200 280 140 110 60	440 260 60	410 180 170 110	450 220 110 50 40	450 310 90 50
11	300 280 250 60	390 300 90 50	380 220 170 60	450 240 110 50	440 360 90
12	530 300 70	340 300 140 100	220 210 180 160 70	450 240 110 50	360 180 120 80 50

Далее мы сравнивали профили экспериментальных электрофореграмм соответствующих конкретной рестриктазе для исследуемых штаммов с профилем для бактерий рода *Arthrobacter*. Для уточнений сходства обращались к данным таблиц 1 и 4.

3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных

Теоретические электрофореграммы, составленные *in silico*, сравнивались с практическими, полученными после электрофоретического разделения продуктов гидролиза ампликонов в агарозном геле (рис. 5-14).

На рисунках 5, 7, 9, 11, 13 представлены только те экспериментальные электрофореграммы, на которых были выявлены профили рестрикции, характерные для рода *Arthrobacter*.

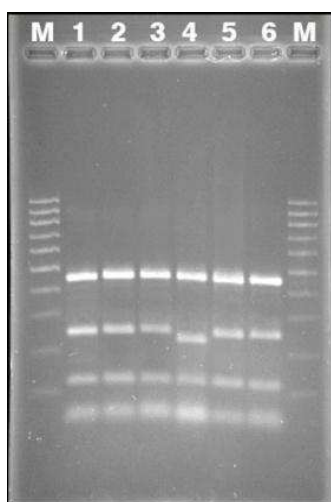


Рисунок 5 – Электрофоретическое разделение после обработки рестриктазой MluC I
 М – ДНК Маркер 100bp
 1 - Образец 1
 2 - Образец 5
 3 - Образец 9
 4 - Образец 10
 5 - Образец 4
 6 - Образец 2

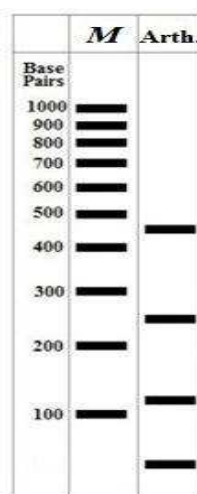


Рисунок 6 – Теоретическая картина электрофоретического разделения для рестриктазы MluC I
 М – ДНК Маркер 100 bp
 Arth. - *Arthrobacter*

Использование рестриктазы MluC I показало, что все образцы кроме 10 имеют одинаковый профиль рестрикции, совпадающий с теоретическим для *Arthrobacter*. Это позволяет сделать вывод, что образец 10 не принадлежит к роду *Arthrobacter*.

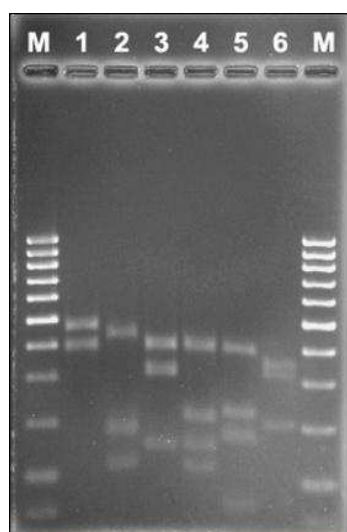


Рисунок 7 – Электрофоретическое разделение после обработки рестриктазой Hae III
 М - ДНК Маркер 100+50bp
 1 - Образец 2
 2 - Образец 6
 3 - Образец 1
 4 - Образец 5
 5 - Образец 11
 6 - Образец 7

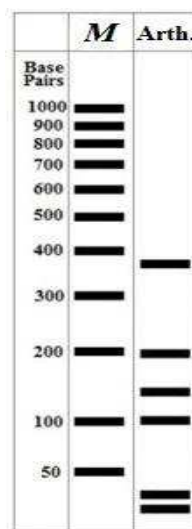


Рисунок 8 - Теоретическая картина электрофоретического разделения для рестриктазы Hae III
 М – ДНК Маркер 100+50bp
 Arth. - *Arthrobacter*

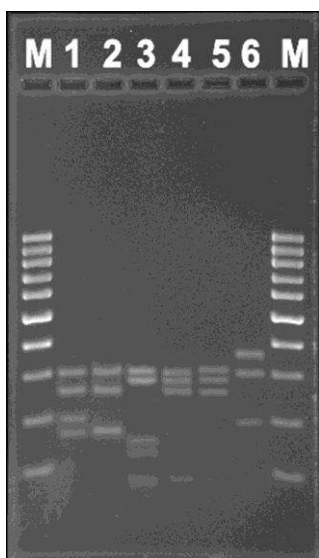


Рисунок 9 –
 Электрофоретическое
 разделение после
 обработки рестриктазой
 BstNI I
 М – ДНК Маркер 100 bp
 1 - Образец 8
 2 - Образец 6
 3 - Образец 5
 4 - Образец 7
 5 - Образец 11
 6 - Образец 2

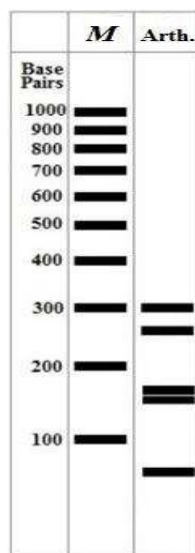


Рисунок 10 -
 Теоретическая картина
 электрофоретического
 разделения для
 рестриктазы BstNI I
 М – ДНК Маркер 100bp
 Arth. - *Arthrobacter*

На электрофореграммах 7 и 9 (при использовании рестриктаз *Hae* III и *Bst*NI I) наблюдается соответствие рестрикционных профилей образца 5 теоретическим картинам рестрикции для рода *Arthrobacter*.

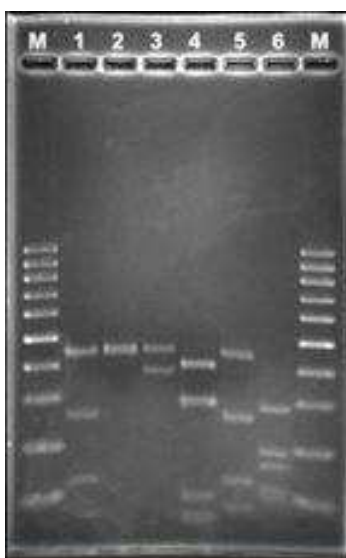


Рисунок 11 –
 Электрофоретическое
 разделение после
 обработки рестриктазой
 BstU I
 М – ДНК Маркер 100 bp
 1 - Образец 5
 2 - Образец 12
 3 - Образец 3
 4 - Образец 11
 5 - Образец 9
 6 - Образец 7

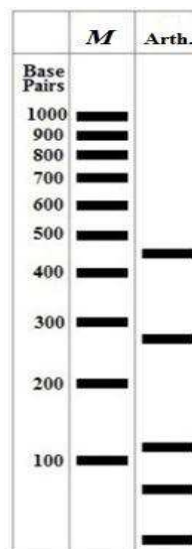


Рисунок 12 -
 Теоретическая картина
 электрофоретического
 разделения для
 рестриктазы BstU I
 М – ДНК Маркер 100bp
 Arth. - *Arthrobacter*

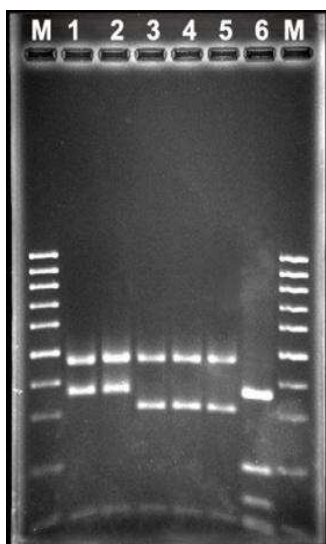


Рисунок 13 –
 Электрофоретическое
 разделение после
 обработки рестриктазой
 Taq I
 М - ДНК Маркер 100bp
 1 - Образец 5
 2 - Образец 9
 3 - Образец 8
 4 - Образец 4
 5 - Образец 6
 6 - Образец 12

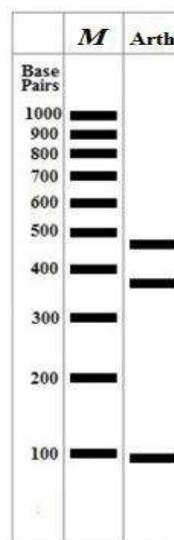


Рисунок 14 -
 Теоретическая картина
 электрофоретического
 разделения для
 рестриктазы Taq I
 М – ДНК Маркер 100bp
 Arth. - Arthrobacter

На электрофореграммах 11 и 13 (при использовании рестриктаз BstU I и Taq I) наблюдается соответствие рестрикционных профилей образцов 5 и 9 теоретическим картинам рестрикции для рода *Arthrobacter*.

Так что, исходя из сравнения теоретических и практических картин распределения рестриктов, был сделан вывод о принадлежности к роду *Arthrobacter* образцов бактерий 5 и 9.

Наименее информативной оказалась эндонуклеаза рестрикции MluC I, так как при её использовании наблюдались одинаковые рестрикционные профили для большинства исследуемых образцов, что не позволило четко выявить среди них бактерии рода *Arthrobacter*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения исследования были выполнены все задачи, поставленные в начале работы. На первом этапе был проведён рестрикционный анализ *in silico* различных штаммов бактерий рода *Arthrobacter*, в результате которого установили размеры рестриктов при использовании эндонуклеаз *Bst*HH I, *Bst*U I, *Hae* III, *Mlu*C I и *Taq* I, характерные для данного рода. Количество и распределение по величинам рестриктов у всех исследованных штаммов оказалось одинаковым. Величины соответствующих по размерам рестриктов отличались не более чем на 1-6 нуклеотид (последнее для самых крупных фрагментов). Так была создана теоретическая основа для идентификации бактерий рода *Arthrobacter* методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена 16S рРНК. Затем была выделена геномная ДНК 12 исследуемых образцов бактерий, из которой методом ПЦР были получены ампликоны 500L-1350R размером около 900 пар оснований, соответствующие выбранному участку гена 16S рРНК. Далее ампликоны обработали эндонуклеазами рестрикции с последующим электрофорезом и документированием электрофореграмм. Полученные экспериментальные электрофореграммы сравнили с теоретическими.

По результатам сравнения теоретических и практически полученных электрофореграмм было установлено, что к роду *Arthrobacter* принадлежат образцы бактерий под номерами 5 и 9.

Из 5 использованных ферментов наименее информативной оказалась эндонуклеаза рестрикции *Mlu*C I, так как при её использовании наблюдались одинаковые рестрикционные профили для большинства исследуемых образцов, что не позволило четко выявить среди них бактерии рода *Arthrobacter*. Остальные использованные эндонуклеазы рестрикции позволили нам идентифицировать среди использованных образцов те, профиль рестрикции которых совпадал с теоретическим для микроорганизмов рода *Arthrobacter*.

Таким образом, результаты данного исследования показали, что метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена 16S рРНК, в дополнение к «традиционным» методам, может служить удобным способом идентификации микроорганизмов при условии грамотного подбора эндонуклеаз рестрикции.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Садченко, Л.С. Современные достижения биотехнологии в медицинской промышленности / Л.С. Садченко. – Москва, 2008.- 213 с.
2. Аковбян, В.А. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций / В.А. Аковбян; под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой. – Москва: Бином, 2012. – 1152 с.
3. Кибирев, Я.А. Современные молекулярно-генетические методы идентификации возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной природы / Я. А. Кибирев, С. Г. Исупов, Д. А. Чухланцев // Военно-медицинский журнал. - 2014. - Т. 335, № 10. - С. 50-54.
4. Янулайтис, А. А. Ферменты рестрикции и их применение / А. А. Янулайтис. - Люберцы: ВИНТИ, 1989. - 202 с.
5. Elgaml, A. Analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of Gram negative pathogenic bacteria isolated from urinary tract infections / A.Elgaml [et al.] // African Journal of Microbiology Research. – 2013. – Vol. 7. – P. 2862-2869.
6. Алмагамбетов, К.Х. Биотехнология микроорганизмов / К.Х. Алмагамбетов. – Астана, 2008. – 244 с.
7. Sahoo, N. K. Biodegradation of 4-chlorophenol by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6: effect of culture conditions and degradation kinetics / N. K. Sahoo, K. Pakshirajan, P. K. Ghosh // Biodegradation. – 2011. – Vol. 22, No. 2. – P. 275-286.
8. Емцев, В.Т. Микробиология: учебник для вузов / В.Т Емцев, Е.Н Мишустин. – 5-е изд.; перераб. и доп. – Москва: Дрофа, 2005. – 445 с.

9. Прозоров, А. А. Дополнительные хромосомы бактерий: свойства и происхождение / А. А. Прозоров // Микробиология. – 2008. – Т. 77, № 4. – С. 437 – 447.
10. Wang, W. Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria / W. Wang [et al.] // Science. – 2011. – Vol. 333. – P. 1445–1449.
11. Патрушев, Л. И. Экспрессия генов / Л. И. Патрушев. – Москва: Наука, 2000. – 830 с.
12. Квитко, К.В. Генетика микроорганизмов : учеб. пособие / К.В. Квитко, И.А. Захаров, под ред. А.В. Пиневича. – 2-е изд. – Санкт-Петербург : Изд. дом СПб. ун-та, 2012. – 268 с.
13. Шестаков, С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий / С.В. Шестаков // Экол. генетика. - 2007. - Т.5, № 2. – С. 12–24.
14. Третьяк, А.Т. Роль и место ДНК – диагностики в инфекционной клинике / А.Т. Третьяк, Л.П. Востокова, А.Б.Чухловин // Педиатр. – 2013. – Т. 4, № 4. – С.84-92.
15. Guttel, R. Lessons from an evolving rRNA:16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective / R. Guttel, N. Larsen, C. Woese // Microbiological review. – 1994.– Vol.8, No.1. – P.10-24.
16. Pei, A. Diversity of 16S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes/ A. Pei [et al.] // Applied and Environmental microbiology. – 2010. – Vol. 76, No. 12. – P. 3886–3897.
17. Прудникова, С.В. Микробиология: руководство для работ по малому практикуму / С.В. Прудникова, Ц.М. Гукасян, Н.И. Сарматова. - Красноярск : Изд-во КГУ, 2004. - 54 с.
18. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – Москва: КолосС, 2004. – 296 с.


19. Поздеев, О.К. Медицинская микробиология / О.К. Поздеев, под. ред. акад. РАМН В.И. Покровского.– Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 768 с.
20. Сапунова, Л.И. Получение рекомбинантных штаммов актинобактерий рода *Arthrobacter* / Л.И. Сапунова [и др.] // Генетика и биотехнология XXI века. Фундамент. и приклад. аспекты: мат-лы Междунар. науч. конф. – Минск: Изд. центр БГУ, 2008.
21. Чернухин, В.А. Новая эндонуклеаза рестрикции *AluVI* из *Arthrobacter luteus* В- изошизомер *AluI*, нечувствительный к присутствию 5-метилцитозина в сайте узнавания AGCT / В.А. Чернухин [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова. – 2007. – Т. 3 №1. – С. 21-27.
22. Пат. 2115727 Россия, МПК6 C12H 1/26, C02P 3/34 Способ очистки объектов окружающей среды от углеводов нефти и масел / Капотина Л.Н., Морщакова Г.Н., Дедовец С.А. № 97102054/13; Заявл. 17.02.97; Опубл. 20.07.98.
23. Пат. 2142997 Россия, МПК6 C1N001 1/26, C02F 3/34 Штамм *Arthrobacter* sp. для разложения сырой нефти и нефтепродуктов / Власов С.А., Краснопевцева Н.В., Крашенинникова Т.И. № 99112144; Опубл. 27.03.99.
24. Ястребова, О.В. Галотолерантные бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводов рода *Arthrobacter* / О.В. Ястребова, Е.Г. Плотникова // Вестник Пермского университета. – 2007. - № 5. – С. 100-106.
25. Северин, Е.С. Биохимия: учеб. для студ. мед. вузов / под ред. Е. С. Северина.- 5-е изд., испр. и доп. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2011. — 768с
26. Гусейнов, О. А. Методы биохимических исследований: учеб. – метод. пособие / сост. О. А. Гусейнов. – Красноярск: СФУ, 2012. - 42 с.

27. Абрамова, З.И. Введение в генетическую инженерию: учеб. пособие / З.И. Абрамова. - Казань: Казанский университет, 2008.- 169 с.
28. Семёнова, Н. А. Функциональная значимость полиморфизма генов ApoE и SOD2 в формировании хронической HCV-инфекции / Н. А. Семёнова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. - № 3. – С. 64-69.
29. Muthusamy, K. A. Genetic polymorphisms of EGF 5'-UTR and NAT2 857G/A associated with glioma in a case control study of Malaysian patients / K. A. Muthusamy, L. H. Lian, N. Vairavan // Genetics and Molecular Research. – 2012. – Vol. 11. – P. 2939 – 2945.
30. Насибулина, Е. С. Изучение ассоциации полиморфизма Ala54Thr гена FABP 2 с риском развития ожирения, жировой массой тела и физической активностью / Е. С.Насибулина, А. В. Борисова, И. И. Ахметов // Вопр. питания. - 2013. - № 5. - С. 23-28.
31. Ma, H. Paternity Testing / H. Ma [et al.] // Journal of American Science. – 2006. – Vol. 2. – P. 76–92.
32. Hernandez, M. The genomic identification of Colombian *Acinetobacter baumannii* clinical isolates by RFLP-PCR analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region / M. Hernandez, E. Valenzuela, I.Pulido // Rev. Colomb. Biotecnol. – 2011. –Vol.13, No. 1. – P.110-114.
- 33.Зернов, Ю.П. Использование рестрикционного анализа амплифицированного гена 16S РНК для идентификации микроорганизмов на примере бактериальных продуцентов термолабильной щелочной фосфатазы/ Ю. П. Зернов, М. А. Абдурашитов, С. Х. Дегтярев // Биотехнология. – 2005. - № 6. – С. 3-11.
34. Степина, Т.А. Идентификация бактерий - биодеструкторов полигидроксиалканоатов на основе анализа полиморфизма длин фрагментов рестрикции ПЦР – продукта гена 16S рРНК / Т.А. Степина, Т. Н. Кузнецова [и др.] // Фундамент. и приклад. аспекты биотехнологии:

- мат-лы Всерос. науч.-практ. конф. – Иркутск: Изд-во ИРНИТУ, 2015. – 394 с.
35. Ramires, P. Development of a *16S rRNA* PCR-RFLP Assay for Bartonella Identification: Applicability in the Identification of Species Involved in Human Infections / P. Ramires, L. J. del Valle, M. Jaramillo // Universal Journal of Microbiology Research. – 2014. – Vol. 2. – P. 15-22.
36. Бугеро, Н.В. Результаты определения вирулентности *Blastocystis* spp. Методом рестрикционного анализа ДНК простейших / Н.В.Бугеро, Н.И. Потатуркина-Нестерова // Фундаментальные исследования. – 2012. – №11. – С.1049-1054
37. Абдурашитов, М. А. Метод рестрикционного анализа геномов млекопитающих *in silico* / М.А. Абдурашитов, В.Н. Томилов, В.А. Чернухин // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. - 2006. – Т.2., № 3. – С. 29 – 39.
38. Каталог продукции НПО «СибЭнзим» [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://russia.sibenzyme.com/service/PDFs>
39. Каледин, А. С. Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально-термофильной бактерии *Thermus aquaticus* УТИ / А. С.Каледин, А. Г. Слюсаренко, С. И. Городецкий // Биохимия. – 1980. – Т. 45. – С. 644-651.
40. Лопухов, Л. В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике / Л. В. Лопухов, М.В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т.2, № 3. – С. 96 -106.
41. Reece, R.J. Analysis of Genes and Genomes / R.J. Reece. – UK: University of Manchester, 2004. – 469 p.

42. RFLP Method - Restriction Fragment Length Polymorphism [электронный ресурс] – режим доступа: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/RFLP.html>
43. Rasmussen, H. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting / H. Rasmussen // Gel Electrophoresis – principles and basis / ed. by S. Macdeldin. - Rijeka: InTech, 2012. – Ch. 18. - P. 315-335.
44. Гааль, Э. Электрофорез в разделении биологических молекул / Э. Гааль, Г. Мальдеши, Л. Верецкеи. – Москва: Мир, 1982. - 448 с.
45. Macdeldin, S. Gel Electrophoresis – principles and basis / ed. by S. Macdeldin. - Rijeka: InTech, 2012. – 366 p.
46. Slater, G.W. Theory of DNA electrophoresis / G.W. Slater, S. Guillouzie, M.G. Gauthier // Electrophoresis. - 2002. – Vol. 23. – P. 3791-3816.
47. Глушко, А.А. История и перспективы компьютерного конструирования лекарств [электронный ресурс] / А.А. Глушко. – Пятигорск, 2010. - Режим доступа: <http://physcolloid.ru/wp-content/uploads/2013/04/Лекция.pdf>
48. Пономарева, Н.С. Применение расстояний редактирования при биоинформационном анализе геномов для задач оценки состояния репродуктивной системы/Н. С. Пономарева, Г. Н. Реброва, Е. А. Колина//Фундаментальные исследования. – 2015. - №. 7. – С. 774– 777.
49. National Center for Biotechnology Information – [электронный ресурс] : режим доступа <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
50. pDRAW32 [электронный ресурс] – режим доступа: <http://www.acaclone.com>

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой
Е. И. Шишацкая

« 23 » ИЮНЯ 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

«Идентификация бактерий рода *Arthrobacter* методом анализа
полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена 16S рРНК»

Руководитель



доцент, к. б. н.

О. А. Гусейнов

Выпускник



Н.А. Муштукова

Красноярск 2017