

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е. И. Шишацкая

« ____ » _____ 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

«Идентификация бактерий видов *B.cereus*, *B.pumilus* и *B. amyloliquefaciens*
анализом сиквенса гена 16S рРНК»

Научный руководитель _____ доцент, к.б.н. О. А. Гусейнов

Выпускник _____ А. А. Казютина

Красноярск 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Генетика.....	6
1.2 Генетические признаки бактерий	8
1.3 Бактерии рода <i>Bacillus</i>	11
1.4 Ген 16S рРНК.....	13
1.5 Полимеразная цепная реакция	14
1.6 Рестрикция ДНК	16
1.7 Электрофорез ДНК.....	19
1.8 Анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов.....	23
1.9 Анализ <i>insilico</i>	25
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	26
2.1 Объекты исследования.....	26
2.2 Методика выделения ДНК.....	26
2.3 Проведение полимеразной цепной реакции	27
2.4 Проведение реакции рестрикции	28
2.5 Проведение электрофореза.....	31
2.6 Методика очистки ДНК ампликонов	31
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	32
3.1 Выделение ДНК из образцов бактерий	32
3.2 Получение ампликонов гена 16S рРНК	33
3.3 Проведение реакции рестрикции ампликонов 500L-1350R.....	36
3.4 Проведение анализа <i>in silico</i>	36
3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных.....	39
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	43
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	44
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	55
Приложение А	52

ВВЕДЕНИЕ

Род *Bacillus* — это грамположительные аэробные спорообразующие бактерии. Принадлежащие к роду *Bacillus* микроорганизмы представляют собой одну из основных групп микробного сообщества почвы и ризосферы растений. Большинство найденных видов бактерий рода *Bacillus* обладают хозяйственно важными свойствами. Поскольку они способны продуцировать биоконтрольные вещества (антибиотики, сидерофоры, литические ферменты, токсины), фитогормоны и витамины, способны фиксировать азот атмосферы. Бактерий рода *Bacillus* являются высококонкурентными при колонизации растений [1,2].

Представителей рода *Bacillus* применяют в качестве основы микробиологических биопрепаратов. Такое применение этих микроорганизмов предполагает экологически чистый устойчивый подход для увеличения урожайности на сельскохозяйственных предприятиях [3].

Все перечисленные выше свойства представителей рода *Bacillus* делают их наиболее перспективными микроорганизмами для создания микробиологических биопрепаратов, обладающих комплексом хозяйственно ценных свойств [4].

Многие тесты, которые применяют для идентификации бактерий являются существенными для диагностики и массово используются в микробиологии. Их постановка требует значительных затрат времени, колоссального количества сложных сред и реактивов, а так же соблюдения стандартных условий проведения [3,4].

В данной работе показана применимость метода анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена 16S рНК для идентификации микроорганизмов на примере рода *Bacillus*.

Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) является одним из наиболее быстрых, достоверных и наименее затратных

методов идентификации бактерий. В то время как для идентификации некоторых микроорганизмов требуется несколько суток, а то и недель, то используя данный метод результат можно получить в течение дня [5].

Актуальность работы

Род *Bacillus* состоит из многочисленных видов, которые широко распространены в окружающей среде. Некоторые представители рода *Bacillus* могут вызывать болезни у животных и человека. Бактерии рода *Bacillus* широко применяются в биотехнологии.

Поскольку бактерии рода *Bacillus* обладают вышеперечисленными качествами, очень важно уметь быстро идентифицировать данные бактерии.

Цель работы: Идентифицировать бактерии видов *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus* и *Bacillus amyloliquefaciens* среди образцов почвенных бактерий методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена 16S рРНК.

Задачи

1. Провести рестрикцию ампликонов 500L-1350R гена 16S-рРНК бактерий рода *Bacillus* *in silico* с использованием базы данных Genbank.
2. Выделить ДНК из представленных образцов культур идентифицируемых микроорганизмов, определить ее концентрацию и качество.
3. Получить ампликоны 500L-1350R гена 16SpРНК и провести реакции рестрикции с полученными ампликонами, чтобы затем с помощью электрофореграмм определить вид исследуемых бактерий.
4. Провести электрофорез полученных продуктов гидролиза ампликонов рестриктазами Rsa I, BspFN I, BstNI I, Msp I, BstMB I, Taq I, и задокументировать полученные электрофореграммы.

5. Сравнить практические и теоретические картины электрофоретического разделения рестриктов данных ампликонов и сделать вывод по полученным совпадениям о видовой принадлежности исследуемого образца.

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

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Генетика

Генетика – это наука о наследственности и изменчивости [6].

В настоящее время генетика является фундаментом для молекулярной и клеточной биологии. Результаты, которые были получены в области генетики микроорганизмов являются очень значимыми для выявления наиболее важных генетических закономерностей и принципов для всех организмов [6,7].

Изучение структуры и функции генетического материала является чрезвычайно сложной задачей, так как он может самовоспроизводиться, претерпевать изменения и т. д. Более простой по устройству организм является и наиболее подходящей моделью для исследования этих процессов. Было показано, что механизмы передачи генетических признаков из поколения в поколение у высших организмов и бактерий очень схожи. Бактерии являются наиболее подходящими объектами для изучения природы генетического материала, его организации и функционирования [6].

Это обусловлено следующими преимуществами работы с микроорганизмами:

1. Гаплоидное строение генома, что даёт возможность выявить генетические изменения уже в первом поколении бактериальных клеток [8].

2. Высокая скорость размножения [9].

3. Относительно простое строение [10].

4. Удобство культивирования с возможностью быстрого изменения внешних условий [6].

5. Высокая разрешающая способность генетического анализа микроорганизмов с обнаружением мутаций, возникающих с частотой 10^{-9} и менее [11,12].

6. Способность к комбинативной и мутационной изменчивости [6].

Геном микроорганизма – это полная совокупность генов данной особи. Условия среды способствуют экспрессии генов или подавляют их функциональную активность [13].

Генетический код – триплетный, вырожденный, неперекрывающийся, универсальный, с кодонами терминации и инициации. Генетический код прокариот в основном аналогичен коду эукариот [13].

Генетический материал бактериальных клеток представлен двойной спиралью ДНК, состоящей из 2-х комплементарных полинуклеотидных цепей, в каждой из них пуриновые и пиримидиновые основания расположены вдоль остова, построенного из фосфатных групп и дезоксирибозы; 2 цепи поддерживают друг с другом с помощью водородных связей между соответствующими основаниями [14].

В процессе реализации генетической информации у микроорганизмов главную роль играет нуклеоид. Нуклеоид представляет собой замкнутую кольцевидную молекулу ДНК, которая свободно располагается в цитоплазме. Он содержит несколько тысяч отдельных генов. В зависимости от стадии жизненного цикла в клетке микроорганизма чаще всего находятся от одного до четырех копий каждого нуклеоида [6,13].

Ген состоит из нескольких тысяч пар нуклеотидов. Каждый нуклеотид может изменяться, то есть мутировать, являясь единицей мутации – мутоном и единицей рекомбинации – реконом [13].

Согласно схеме, предложенной Жакобом и Моно [15], гены можно подразделить следующим образом:

1. Структурные гены – они определяют синтез необходимых ферментов, которые участвуют в биохимических реакциях [6].

2. Гены-регуляторы – обуславливают синтез белковых веществ. Как правило, это репрессоры, которые имеют высокое сродство к ДНК в гене-операторе и меняющих деятельность структурных генов [16].

3. Гены-промоторы (или промоторная область) – фрагмент ДНК, который находит ДНК-зависимая РНК-полимераза. Данный участок обязательно нужен для начала транскрипции [17].

4. Гены-операторы – являются неотъемлемым связующим звеном между находящимися между структурными генами, промотором и генами-регуляторами. В присутствие вещества-эффектора, репрессор соединяется с ним, теряет родство к оператору и снимается блок со структурных генов, после чего они начинают функционировать. Это сопровождается активацией оперона [6].

Единицей наследственности у всех живых организмов являются гены, которые лежат в ДНК дискретно и линейно. Гены могут самореплицироваться. Последовательность аминокислот в синтезируемом белке определяется последовательностью нуклеотидов в гене [12].

1.2 Генетические признаки бактерий

На сегодняшний момент в систематике микроорганизмов происходят глобальные изменения сложившихся представлений, который благодаря своему быстрому темпу развития и значимости происходящих перемен, совершенно заслуженно называется революцией, её результатом является переход таксономических исследований на новый более высокий уровень [13].

Нуклеотидный состав ДНК – первостепенная характеристика генома, которую стали применять в систематике прокариот. Выявление соотношения гуанина и цитозина в ДНК (моль % ГЦ) относится к части необходимого

стандартного описания бактериальных таксонов, включая и актиномицетов. Метод ДНК-ДНК гибридизация остается главным при идентификации штаммов бактерий. С помощью материала, собранного за несколько десятков лет, была показана высокая корреляция между результатами ДНК–ДНК гибридизации и фенотипическими характеристиками [14].

Уровень ДНК–ДНК гибридизации указывает степень, в которой одноцепочечные молекулы ДНК различного происхождения могут реассоциироваться в двойную цепь [13,15].

При сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК можно наблюдать высокую степень разрешения этого метода при исследовании родства между организмами на уровне вида. Ген 16S – рРНК высококонсервативный ген. Данные о нуклеотидных последовательностях генов 16S рРНК очень большого числа всех представителей родов и большинства видов живых организмов имеются в базах данных. Таких как например : RDB II, NCBI [15].

Методы ДНК-типирования массово применяется в разнообразных отраслях микробиологии. Вместе с фенотипическими подходами, они нацелены на установлении биоразнообразия среди близкородственных микроорганизмов в основном на уровне вид-подвид-штамм [16].

Все методы генотипирования можно объединить в несколько групп. Первая группа охватывает подходы и методы, основанные на анализе фрагментов рестрикции целого генома– LFRFA (Low Frequency Restriction Fragment Analysis – анализ низкочастотных рестрикционных фрагментов) [17].

Ко второй группе методов генотипирования относят использование полимеразной цепной реакции (ПЦР), включающее: реакции амплификации ДНК с произвольными праймерами – это RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) [18].

Методы REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic sequence – повторяющиеся экстрагенные палиндромные последовательности) основаны на применении праймеров, комплементарных консервативным повторяющимся последовательностям в ДНК. Эти последовательности рассеяны по геному бактерий [19].

Третья группа методов объединяет как ПЦР, так и рестрикционный анализ ДНК. Такие методы целесообразно использовать для анализа рестрикционных фрагментов определенных генов – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов ДНК), генов 16S рРНК – ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis – рестрикционный анализ амплифицированных рибосомальных ДНК) или целого генома – AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – полиформизм длины амплифицированных рестрикционных фрагментов ДНК) [20].

После проведения сравнительного исследования было показано, что методы, описанные выше позволяют получить необходимую и информацию не только о видовой принадлежности микроорганизмов, но так же с их помощью можно идентифицировать бактерии до штамма [21,22].

Исходя из этого, современная систематика прокариот, обладает большим количеством методов, с помощью которых можно решить различные классификационные и идентификационные задачи. Необходимо выбрать метод исходя из от конкретных задач исследования. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК имеет высокую степень разрешения этого метода при рассмотрении родства между организмами на видовом уровне, поскольку ген 16S рРНК – высококонсервативный ген. Информация о нуклеотидных последовательностях генов 16S рРНК большинства прокариотических организмов имеются в соответствующих базах данных (RDB II, NCBI). С их помощью можно установить родовую и видовую принадлежность микроорганизмов. Методы генотипирования очень часто

используются в во многих отраслях биологии, медицины, сельского хозяйства и биотехнологии, вследствие их высокой разрешающей способности, простоты анализа, высокой скорости получения конечного результата, возможности автоматизации процесса, создания банков данных и др [22,23].

1.3 Бактерии рода *Bacillus*

Бактерии рода *Bacillus* имеют большое значение для микробиологов, поскольку данный род микроорганизмов широко распространён на Земле. Эти бактерии довольно часто исследуют в виду особенностей цикла развития, сверхустойчивости их спор к различным воздействиям [24].

Сразу после открытия такой формы жизни как споры, была доказана их невероятная устойчивость среди проживающих на нашей планете форм жизни. У спор метаболизм отсутствует, при этом они имеют необычайно высокую степень устойчивости к инактивации различными разрушающими факторами, включая УФ и γ -излучение и др. Несмотря на отсутствие обмена веществ, споры способны осуществлять непрерывный контроль наличия или отсутствия необходимых питательных элементов в среде, а так же она способны практически мгновенно реагировать на поступление необходимых для них питательных элементов, прорастая и возобновляя вегетативный рост. В состоянии покоя споры проявляют крайнюю степень устойчивости на долгое время и обнаружить их возможно в любой среде обитания на Земле [25].

Род *Bacillus* – это одна из наиболее разнообразных и коммерчески полезных групп микроорганизмов. Отдельные штаммы данного рода способны выносить значительные колебания температур, а так же резкие изменения значения pH. Всё выше сказанное, делает род *Bacillus* важным микроорганизмом для создания коммерческих препаратов – ферментов [26].

На сегодняшний момент некоторые штаммы *Bacillus* применяются для создания следующих продуктов: различных ферментных препаратов, антибиотиков, высокоочищенных биопрепаратов, в том числе усилители вкуса и аромата, а так же пищевые добавки и инсектициды [27].

Исследование рода *Bacillus* проводится в разнообразных областях, от пищевой промышленности, до биотехнологии и генной инженерии. В то же время, бактерии рода *Bacillus* имеют место и в экологических исследованиях, поскольку могут колонизироваться на разнообразных местах обитания [28,29].

Bacillus pumilus - это повсеместные грамположительные, аэробные, стержнеобразные эндоспорообразующие бактерии, которые присутствуют в почве, растениях и окружающей среде и в глубинах базальтовых пород. Споры *Bacillus pumilus* демонстрируют устойчивость к ультрафиолетовому излучению и H₂O₂ [30].

Бактерии вида *Bacillus pumilus* участвуют в широком спектре симбиотических отношений. *B. pumilus* могут способствовать росту ризобактерий в сельскохозяйственных растениях, таких как красный перец и пшеница [31,32].

B. pumilus обладают антибактериальной и противогрибковой активностью. Плазмиды *B. pumilus* участвуют в системах переноса генов. Протеазы из *B. pumilus* используются в различных отраслях промышленности: пищевой, химической, кожевенной, а так же в медицине [13,14,33].

Некоторые штаммы бактерии вида *Bacillus cereus* могут быть патогенными. Они могут вызывать отравления человека через пищевые продукты. Так же они способны при определенных условиях могут привести к маститу крупного рогатого скота. В первую очередь патогенность *Bacillus cereus* связана с выделением разрушающих ткани экзоферментов. Пищевые токсикозы – это одна из злободневных проблем нашего времени. Отравление следует ввиду недостатка систем профилактических мер, плохого

мониторинга и контроля инфекции, при употреблении пищи, не прошедшей полной температурной обработки, а так же при нарушении санитарных норм хранения пищевых продуктов. Рутинные методы лабораторной идентификации бактерий вида *Bacillus cereus* осложняет получение полноценных сведений о значении данного вида в возникновении пищевых отравлений продуктами питания различного происхождения [13,34,35].

Bacillus amyloliquefaciens – грамположительная бактерия палочковидной формы. Данные бактерии широко применяется в агрокультуре. Они заселяет корни растений и являются эндосимбионтами. Вид *Bacillus amyloliquefaciens* используется в агрокультуре, аквакультуре и гидропонике [36].

B. amyloliquefaciens может противостоять с бактериальными и грибковыми патогенными организмами. Кроме того он может повышать устойчивость корней к неблагоприятным факторам внешней среды, вызывающих у растений стрессовое состояние. А так же используется человеком в качестве источника ферментов, таких как альфа-амилаза (часто используется в гидролизе крахмала), субтилопептидаза А (неспецифичная протеаза, аналогичная трипсину), рестриктаза II типа [36,37].

1.4 Ген 16S рРНК

Для оценки состава микробных микробиоценозов часто применяют традиционные микробиологические методы исследования, подразумевающие культивирование чистых культур микроорганизмов. В некоторых случаях целесообразно воспользоваться молекулярными методами определения видовой принадлежности микроорганизмов по последовательностям маркерных генов, без их культивирования [37].

С помощью секвенирование (прочтение нуклеотидной последовательности) фрагментов генома микроорганизмов можно определить видовую и (или) родовую принадлежность организмов. В некоторых случаях удобно использовать секвенирование отдельных фрагментов гена 16S рибосомальной РНК. Главным достоинством секвенирования гена 16S рРНК – можно считать его наличие во всех без исключения микроорганизмах [38].

При исследовании различных видов бактерий применяются универсальные праймеры, которые избирательны к эволюционно консервативным участкам геномной ДНК. У всех бактерий есть консервативные участки геномной ДНК. Их называют маркерами. Поиск последовательности нуклеотидов такого участка позволяет выяснить, какому геному бактерии он соответствует. При метагеномных исследованиях бактериальных сообществ, присутствующих в образце (субстрате), чаще всего применяют подход, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей гена, ответственного за синтез малой субъединицы 16S рибосомальной РНК (16S рРНК). Последовательность гена 16S рРНК складывается из 9 гипервариабельных регионов [39,40].

В генетических базах данных можно найти уже изученные последовательности гена 16S-рРНК большого числа микроорганизмов. Что делает возможным сопоставлять полученные последовательности с уже имеющимися в базах данных, исходя из этого можно идентифицировать различные виды и штаммы микроорганизмов [40,41,42].

1.5 Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий значительно увеличить малые концентрации определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе) [43,44].

Для проведения ПЦР требуются следующие компоненты:

- 1) ДНК-матрица, с тем участком ДНК, который необходимо амплифицировать.
- 2) Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- 3) Термостабильная ДНК-полимераза — энзим, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна выдерживать высокие температуры длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermusaquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcusfurius* (Pfu-полимераза), *Pyrococcuswoesei* (Pwo-полимераза) и другие.
- 4) Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- 5) Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
- 6) Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин [45].

Ход реакции

1. Денатурация, или «плавление» ДНК. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94 – 96°C (или до 98°C, если используется особенно термостабильная полимеразы) на 0,5 – 2 минуты, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Иногда перед первым циклом (до добавления полимеразы) проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2 – 5 минут для полной денатурации матрицы и праймеров. Такой прием называется горячим стартом, он позволяет снизить количество неспецифичных продуктов реакции [43,44].

2. Отжиг – связывание праймеров с матричной ДНК. Когда цепи разошлись, температуру медленно понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается 50-65°C. Время стадии – 20 – 60 секунд. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифичных продуктов (при заниженной температуре) [43.45].

3. Элонгация (синтез цепи). ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве «затравки». Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей и движется вдоль матрицы. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72°C. Время синтеза зависит от типа ДНК-полимеразы и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований [44].

1.6 Рестрикция ДНК

В ходе эволюционного процесса для бактерий стало возможным синтезировать так называемые рестриктазы (эндонуклеазы рестрикции), которые в последствии стали одной из составляющих бактериальной системы рестрикции-модификации. У микроорганизмов такие системы оказались внутриклеточной иммунной системой защиты от чужеродной ДНК. Разница микроорганизмов в защите от чужеродной ДНК (ДНК растений и животных, в организме которых они обитают) происходит внутриклеточно, т. е. тогда, когда чужеродная ДНК проникает в цитоплазму бактерий, в отличие от высших организмов, у которых идентификация и уничтожение вирусов, бактерий и других патогенов происходит внеклеточно. Для защиты бактерии в ходе эволюции развили также способность к метилированию основаниями на

определенных последовательностях. Поэтому чужеродная ДНК из-за того, что в ней нет метильных групп на тех же последовательностях разрезается на фрагменты разными бактериальными эндонуклеазами рестрикции, а затем деградируется бактериальными экзонуклеазами до нуклеотидов. Таким способом бактерии ограждают себя от ДНК растений и животных, в организме которых они обитают временно (как патогены) или постоянно (как сапрофиты) [45].

Эндонуклеазы рестрикции впервые были выделены из *E. coli* в 1968 г. Выяснилось, что они способны плавить молекулы ДНК на разных сайтах рестрикции. Эти ферменты получили название эндонуклеаз класса I. После этого, у микроорганизмов обнаружили эндонуклеазы класса II, которые распознают в чужеродной ДНК сайты рестрикции и на этих сайтах тоже осуществляют рестрикцию. Такие ферменты широко используют в генной инженерии. В то же время были обнаружены ферменты класса III, которые способны плавить ДНК рядом с сайтами распознавания, но данные ферменты не нашли применения в генной инженерии [46,47].

Действие системы рестрикции-модификации «рационализуется» так называемыми палиндромными азотистых оснований, которые являются сайтами рестрикции ДНК. Палиндромные последовательности — это последовательности оснований, которые одинаково читаются вперед и назад. Так как цепи ДНК характеризуются антипараллельным направлением, то можно говорить, что последовательность является палиндромной, если она одинакова, когда прочитывается в направлении от 5'- к 3'-концу на верхней и 3'- к 5'-концу на нижней цепи [46].

Существуют палиндромы самых разнообразных размеров, но преимущественно используются для узнавания рестриктазами, сайты, состоящие из четырех, пяти, шести и редко восьми оснований [46,47].

Рестриктазы — это несомненно незаменимый фермент в генной инженерии для разрезания нужных участков генов из крупных молекул ДНК. Так как известно более ста эндонуклеаз рестрикции, то представляется возможным выбрать рестриктазу и избирательное разрезание участков из ДНК [46].

Отличием эндонуклеаз рестрикции является то, что они выполняют разрезы молекул на несколько фрагментов-рестриктов ДНК уступами, в конечном итоге в полученных концах одна цепь длиннее другой, образуется так называемый «хвост». Эти концы (хвосты) называются «липких» [47].

После проведения рестрикции ДНК от рестрикционной смеси отделяют ДНК-рестрикты, которые нужны в дальнейшем для соединения с вектором. Для выявления ДНК-рестриктов проводят электрофорез, так как с его помощью рестрицированную ДНК легко фракционировать благодаря размерам фрагментов-рестриктов [46].

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) часто применяются при картировании геномов, клонировании генов, генотипировании и других молекулярно-генетических исследованиях в качестве «молекулярных ножниц» [47].

На активность ферментов и полноту гидролиза ДНК может повлиять множество факторов – температура инкубации, ионный состав буфера, метод выделения ДНК и степень ее загрязненности, а также уровень метилирования ДНК и специфичность метилирования. О результатах реакции рестрикции можно судить проведя электрофорез в агарозном геле. Небольшие по размеру молекулы плазмидной или вирусной ДНК при ферментативном гидролизе с помощью какой-либо рестриктазы дают определенное ограниченное количество рестриктов. Препараты геномной ДНК из-за большого количества рестрикционных сайтов и неизбежной фрагментации ДНК при ее изоляции из клеток дают при электрофорезе шлейф из фрагментов ДНК или «шмер» [46].

Для той или иной ДНК с известной первичной структурой стало возможным выявить число и месторасположение всех сайтов рестрикции с применением специализированных программ для рестрикционного картирования [47].

1.7 Электрофорез ДНК

Электрофорез — это перемещение частиц дисперсной фазы в жидкой или газообразной среде под влиянием внешнего электрического поля. Первые исследования проводили ученые Московского университета П. И. Страхов и Ф. Ф. Рейсс в 1809 году. Электрофорез представляет собой один из наиболее важных методов для разделения и анализа компонентов веществ в химии. Данный метод широко применяется для разделения смесей биомолекул на фракции или индивидуальные вещества. Он используется в биохимии, молекулярной биологии, клинической диагностике [37].

В 70-ых годах выяснилось, что при помощи гель-электрофореза возможно определить длину и чистоту молекул ДНК, кроме того разделить их и выделить отдельные фрагменты. Данный метод можно считать простым, потому что каждый нуклеотид в молекуле нуклеиновой кислоты имеет отрицательный заряд, он способен притягиваться к положительному электроду. Для того чтобы разделить молекулы ДНК, исходя из их размера, электрофорез проводят в агарозных или полиакриламидных гелях (ПААГ). С помощью таких гелей можно разделить фрагменты ДНК длиной до пятисот нуклеотидов, которые отличаются только на несколько нуклеотидов. Так как поры в ПААГ для крупных молекул ДНК слишком малы, то для разделения больших молекул ДНК по размеру были разработаны специальные гели на основе агарозы (полисахарида, выделяемого из морских водорослей). Два этих способа разделения ДНК масштабно применяются для аналитических и препаративных целей [39].

При помощи электрофореза стало возможным за короткий срок разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые нельзя разделить иными способами, к примеру, центрифугированием в градиенте плотности [37].

Агарозный гель целесообразно применять для разделения молекул ДНК по размеру, определения размера фрагментов ДНК с помощью маркеров (молекул ДНК с известными молекулярными массами). Электрофорез делает возможным определение количества ДНК по интенсивности свечения полос ДНК в УФ свете благодаря красящему веществу бромистому этидию. Если посмотреть покрашенный гель в УФ свете, то можно заметить даже 1 нг ДНК [39].

Компоненты электрофореза в агарозном геле:

Агароза: Природный коллоид, который выделяют из некоторых видов красных водорослей, является линейным полисахаридом (средняя молекулярная масса ~12 000 Да). Агарозные гели содержат крупные «поры» и применяются, в частности, для разделения крупных молекул [39].

Разделение в агарозных гелях происходит с ограниченным разрешением, так как полосы, возникающие в агарозных гелях, имеют тенденцию диффундировать и распространяться в стороны. Это происходит поскольку поры большого размера. Агарозные гели получают суспендированием сухого порошка агарозы в водном буфере, и кипячением смеси до того момента, пока не произойдет плавление агарозы и не образуется бесцветный раствор. После чего, раствор наливают на подложку и остужают до температуры 20-25°C, для того чтобы образовался плотный гель. При застывании агароза образует матрикс, размеры пор которого определяются концентрацией [37,39].

В соответствии с концентрацией агарозы участок ДНК, заданного размера способен двигаться в геле на разные расстояния [39].

Буферы для электрофореза: Состав и ионная сила буфера для электрофореза оказывают влияние на электрофоретическую подвижность. В буфере с высокой ионной силой электропроводность достаточно хорошая, и выделяется много тепла. В то же время есть опасность того, что гель может расплавиться [37,39].

На сегодняшний момент есть несколько буферов для электрофореза ДНК, содержащие EDTA и Tris-ацетат (TAE), Tris-борат (TBE), или Tris-фосфат (TPE) в концентрации примерно равной 50 мМ (pH 7,5–7,8) [37].

ДНК маркеры: При указанных напряжении, концентрации агарозного геля и буфере, расстояние перемещения зависит от молекулярного веса биополимера. В связи с этим, маркерная ДНК заданного размера должна быть нанесена на дорожки и с левого, и с правого края геля. Маркер обычно имеет специальный набор известных фрагментов ДНК, их наличие упрощает определение размера исследуемой ДНК [37,39].

Буфер для нанесения: Образцы ДНК предварительно необходимо смешать с буфером для нанесения, чаще всего он содержит в своём составе воду, сахарозу и краситель (например: ксиленцианол, бромфеноловый синий, бромкрезол зелёный и т. д.). От числа фрагментов зависит наибольшее количество ДНК, которое может быть нанесено. С помощью этидиум бромид на снимках геля можно обнаружить крайне маленькое количество ДНК, которое составляет минимум 2 нг в полосе, шириной 0.5 см. Если в полосе такой ширины находится более 500 нг ДНК, значит дорожка перегружена, что приводит к размыванию полосы [39].

Буфер для нанесения используется для:

- Увеличение плотности образца для обеспечения попадания ДНК на дно лунки

- Добавления красителя к образцу, чтобы облегчить процесс нанесения

- Добавление к образцу такого красителя, который в электрическом поле будет двигаться в сторону анода на предсказуемое расстояние [35].

Скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяется пятью главными параметрами:

Размер молекул ДНК. Чем больше молекула ДНК, тем медленнее она перемещается в геле [36].

Концентрация агарозы. Фрагменты ДНК перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными скоростями. Таким образом, применяя гели разных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру [36,37].

Конформация ДНК. ДНК с одинаковыми молекулярными массами, но разными конформациями, например кольцевая неповрежденная (форма I), кольцевая с одноцепочечным разрывом (форма II) и линейная (форма III), движутся в агарозном геле с разными скоростями. Чаще всего линейная форма (форма III) мигрирует медленнее всех [37].

Напряженность электрического поля. При низких напряженностях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. При этом с увеличением напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает. Следовательно, с увеличением напряженности область эффективного разделения ДНК в агарозном геле снижается. Максимальное разделение фрагментов происходит при напряженности, не превышающей 5 В/см. При большом напряжении и малой концентрации агарозы может возникнуть краевой эффект, когда крайние

дорожки начнут изгибаться. При таком эффекте общий электрофоретический профиль выглядит как выпуклая линза [37,39].

Самым лучшим способом визуализации ДНК в агарозных гелях, является окрашивание флуоресцирующим красителем (этидиум бромидом). Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. Интеркаляция — это обратимое включение молекулы или группы между другими молекулами или группами. Итогом этой интеркаляции в непосредственной близости от оснований, краситель связывается с ДНК, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции. УФ-излучение, поглощаемое ДНК в области 260 нм, и передаваемое на краситель (или же излучение, поглощаемое самим красителем при длинах волн 302 и 366 нм), испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм). Часто раствор бромистого этидия добавляют и в гель, и в электрофоретический буфер. В его присутствии электрофоретическая подвижность линейной двухцепочечной ДНК уменьшается приблизительно на 15%, но в тоже время за процессом разделения можно следить под источником ультрафиолетового излучения во время или в конце разделения. Существует способ проводить электрофорез без использования бромистого этидия и проводить окрашивание ДНК уже после завершения разделения. При этом способе гель необходимо поместить в электрофорезный буфер или воду, содержащие этидиум бромид, на пол часа при комнатной температуре. Бромистый этидий является мутагеном [37,39].

1.8 Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) — это способ исследования геномной ДНК, посредством разрезания ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов путем гель-электрофореза [55].

При использовании данного метода получаются различные результаты от различных образцов, и поэтому можно найти некоторые различия в последовательности нуклеотидов ДНК, в случае, когда они располагаются в сайте рестрикции[56].

Наличие в геномной ДНК сайтов рестрикции и их порядок, определенно, формируются последовательностью нуклеотидов исследуемой ДНК, так как сам сайт рестрикции — является четко установленная последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая и разрезаемая эндонуклеазами рестрикции. Вследствие этого, каждая мутация, меняющая последовательность нуклеотидов сайта рестрикции, разрушает этот сайт. Разрезание всей исследуемой геномной ДНК отдельными эндонуклеазами рестрикции приводит к формированию определенного набора фрагментов ДНК, число и размеры которых соответствуют расположению сайтов рестрикции. Мутационную изменчивость в сайтах рестрикции можно идентифицировать по изменению длины рестрикционных фрагментов ДНК. Если в одном сайте рестрикции присутствует мутация, то этот сайт остается нерасщепленным после завершения рестрикции, что приводит к слиянию находящихся рядом рестрикционных фрагментов ДНК, которые разделяются мутантным сайтом, и образуют фрагмент ДНК большего размера. В итоге появляются полиморфные длины рестрикционных фрагментов ДНК, которые содержат мутантные сайты, что выясняется при сравнении ДНК из различных источников методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов [55,56].

Под полиморфизмом ДНК подразумевается наличие варибельности в последовательности нуклеотидов в одном и том же гене у близкородственных видов. Мутационная изменчивость в виде точечных мутаций, а так же при единичных нуклеотидных заменах, ошибках при репликации ДНК, таких как инсерции или делеции, протяжённостью от 1 до 100 или нескольких тысяч нуклеотидов, делециями, вставками, транслокациями, транспозициями мобильных генетических элементов, приводят к полиморфизму ДНК. Все

перестройки в первичной структуре ДНК приводят к изменениям длины фрагментов, возникающих под действием эндонуклеаз рестрикции [50].

1.9 Анализ *insilico*

По аналогии с экспериментами *invivo* (в живом организме) и *invitro* (в пробирке) биологические эксперименты, осуществленные на компьютере, в настоящее время стали называть *insilico* (компьютерный эксперимент) [51,52,53].

Данный метод делает возможным анализировать нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности, используя специальное программное обеспечение, с его помощью производят: выравнивание последовательностей, поиск гомологичных последовательностей ДНК, РНК и белков, картирования генома. Осуществляют такие манипуляции, как теоретические амплификацию, рестриктирование, электрофорез. Геномы могут иметь длину до нескольких миллиардов пар нуклеотидов. Данный метод позволяет анализировать различные геномы за короткое время, осуществлять поиск нужных последовательностей ДНК, РНК, белков и работать с ними [52,53].

В последнее время имеется большое количество генетических баз данных, которые находясь в открытом доступе на специализированных порталах. Математическая, аналитическая и программная обработка данных последовательностей имеет явное преимущество перед экспериментальными исследованиями в области трудоемкости, стоимости и времени [53].

Применение биоинформационного подхода позволяет планировать и моделировать эксперименты для того чтобы снизить вероятность ошибки в ходе практического эксперимента, а также снизить количество потребляемых ресурсов [54,55].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Образцы биомассы почвенных бактерий предоставила магистрант кафедры биотехнологии Ольга Кондратенко. В работе были использованы 11 образцов бактерий.

Образцы бактерий *Escherichiacoli*K-12 и *Klebsiellap.* использовались в работе в качестве маркеров для более точного определения длин фрагментов рестрикции исследуемых образцов.

2.2 Методика выделения ДНК

Методика выделения ДНК с помощью набора SILICAuni основана на сорбции преимущественно высокомолекулярной фракции нуклеиновых кислот суспендированными частицами оксида кремния, что позволяет производить пробоподготовку для ПЦР с минимальными потерями, и обуславливает качество препарата ДНК, оптимальное для ПЦР. Основной компонент лизирующей смеси – гуанидинтиоцианат. Продолжительность подготовки образцов с помощью набора SILICA uni составляет около 1 часа. Полученные препараты ДНК можно сразу использовать для ПЦР без определения концентрации ДНК в них и дополнительного разбавления.

Набор реагентов SILICA uni применяется для выделения ДНК из большинства живых тканей и биологических жидкостей животного, растительного и микробиологического происхождения.

Набор реагентов SILICA uni основан на использовании лизирующего буфера с гуанидинтиоцианатом, который предназначен для лизиса клеток, солюбилизации клеточного дебриса, а также для денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии лизирующего буфера, ДНК активно связывается с

сорбентом, затем легко отмывается от белков и солей отмывочными спиртовыми буферами. ДНК, элюированная из сорбента буфером TE может быть напрямую использована для ПЦР [56].

2.3 Проведение полимеразной цепной реакции

При постановке реакции ПЦР для 11 проб сначала была приготовлена смесь с запасом на 13 образцов:

Для получения ампликонов ограниченных последовательностями праймеров:

500 L – 5'-CGTGCCAGCAGCCGCGGТАА-3'

1350 R – 5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3'

- 390 мкл H₂O_(дист)
- 60 мкл 10×буфера
- 60 мкл dNTP (0,5 мМ водного раствора каждого)
- 30 мкл + 30 мкл праймеров (по 2 мМ водного раствора каждого)
- 30 мкл MgCl₂ (50 мМ водного раствора)

Все компоненты смеси были смешаны в 1 пробирке. В отдельные 11 пробирок добавили по 46 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемой ДНК бактерий. Смесь готовили на ледяной подставке.

Тaq полимеразу добавить в последнюю очередь по 2 мкл.

Программа ПЦР:

1. 95°C – 4:00 мин;
2. 95°C – 0:16 сек;

3. 58°C – 0:22 сек;
4. 72°C – 0:22 сек;
5. GO TO 2 36 times;
6. 72°C for 6:30 мин;
7. 4°C – 18:00:00;
8. END.

Амплификацию проводила на приборе Bio-rad - MJ Mini Personal Thermal Cycler.

Далее провела электрофорез продуктов амплификации. Электрофорез продуктов амплификации ДНК показал, что реакция ПЦР прошла успешно, были получены копии участка ДНК гена 16S-рРНК длиной около 900 пар оснований.

2.4 Проведение реакции рестрикции

Реакцию проводили в 50 мкл реакционной смеси. При постановке реакции рестрикции для 11 проб сначала была приготовлена смесь с запасом на 16 образцов для каждой рестриктазы. Смесь готовили на ледяной подставке.

- 500 мкл воды
- 80 мкл 10×SE буфера (для каждой рестриктазы свой буфер)
- 80 мкл BSA
- 32 мкл фермента рестриктазы (1000 е.а.)

В отдельные 11 пробирок было добавлено по 40 мкл из общей смеси и 10 мкл ДНК ампликонов исследуемых бактерий.

Время реакции рестрикции - 2 часа. Температура для каждой рестриктазы выставлялась разная, для каждой своя.

Рестриктию проводили в термомиксе Eppendorf - ThermoStat plus.

Для визуализации результатов рестрикции продукты реакции подвергались электрофорезу в агарозном геле.

В работе использовали рестриктазы фирмы «SibEnzyme» (Таблица 1).

Таблица 1 -Используемые рестриктазы фирмы «SibEnzyme»

Рестриктаза	Rsa I	BstFN I	BstHI I	Msp I	BstMB I	Taq I
Сайт узнавания	5'-GT [^] AC-3' 3'-CA [^] TG-5	5'-CG [^] CG-3' 3'-GC [^] GC-5'	5'-GCG [^] C-3' 3'-C [^] GCG-5'	5'-C [^] CGG-3' 3'-GGC [^] C-5'	5'- [^] GATC-3' 3'-CTAG [^] -5'	5'-T [^] CGA-3' 3'-AGC [^] T-5'
Оптимальная температура, °C	37	37	50	37	65	65
Температура инактивации, °C	80	65	80	65	80	80
Концентрация, е.а./мл	10000	5000	50000	10000	5000	20000

Все использованные рестриктазы имеют тетрануклеотидный сайт узнавания, что позволяет получать от 3 до 7 фрагментов ДНК в результате расщепления продукта амплификации, имеющего длину порядка 900 п.о.

2.5 Проведение электрофореза

Реактивы:

- 0,85 г порошка агарозы
- 50 мл электрофорезного буфера TAE

- ДНК - маркеры (100bp)
- 6 x буфер для нанесения пробы(ксиленцианол FF, метиленовый синий, глицерин и вода)
- Дистиллированная вода
- Образцы ДНК микроорганизмов

Необходимое оборудование для проведения электрофореза:

1. Источник питания Bio-RadPowerPacHV (1-400 Вт, 0,01-500 мА, 20-5000 В)
2. Камера для горизонтального электрофореза (гель 7x10) Mini-SubCellGT, Bio-Rad.
3. Гель-документирующая система Bio-RadGelDocXRc компьютером.

Ход работы:

- 1) Добавили порошок агарозы в буфер для электрофореза.
- 2) Полученную смесь нагревали в микроволновке до тех пор, пока агароза не образовала равномерную суспензию. Суспензию довели до начала кипения, затем 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 соотн. 3:7 (буфер для нанесения содержит глицерин и отриц. заряженные молекулы

красителя) в отдельном планшете; с помощью дозатора-микропипетки внесли смесь в лунки геля под электрофорезный буфер ТАЕ.

- 7) Подсоединили электроды к источнику напряжения. Время при проведении электрофореза - 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.

2.6 Методика очистки ДНК ампликонов

Очистку ампликонов проводили с помощью набора фирмы IsogeneLaboratoryDiatom™DNAClean-Up.

Набор для простого и эффективного выделения ДНК из биологических образцов основан на избирательной сорбции ДНК на поверхности стеклянных шариков в присутствии высокой концентрации хаотропного агента. Процесс сорбции ДНК проводили в объеме 100 мкл, а выделение ДНК - в микропробирке фирмы Эппендорф (0,2 мл). Выделенную ДНК можно использовать в молекулярно-биологических реакциях без дополнительной очистки. Набор предназначен для очистки 100 образцов ПЦР продуктов объемом до 100 мкл и содержанием ДНК не более 20 мкг или 50 образцов ДНК объемом 200 мкл и содержанием ДНК не более 40 мкг, или большего объема ПЦР продукта при соблюдении объемных пропорций компонентов набора.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Из текста бакалаврской работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

dATP – дезоксиаденозин трифосфат

dGTP – дезоксигуанозин трифосфат

dCTP – дезоксицитидин трифосфат

dTTP – дезокситимидин трифосфат

п.о. - пары оснований

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Баубекова, Д. Г. Ростстимулирующая активность микроорганизмов рода *Bacillus* / Д. Г. Баубекова // *Universum: химия и биология*. – 2014. – № 7. – С. 30-37.
2. Kumar, P. Diversity of *Bacilli* from Disease Suppressive Soil and their Role in Plant Growth Promotion and Yield Enhancement / P. Kumar, S. Khare, R. C. Dubey // *New York Science Journal*. — 2012. — № 5(1). — P. 90-111.
3. Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для управления здоровьем растений : учеб. пособие для студентов спец. «Биология» / М. В. Штерншис, А. А. Беляев, В. П. Цветкова, Т. В. Шпатова [и др.]. – Новосибирск : Гос. аграрный ун-т, 2016. – 337 с.
4. Чеботарь, В. К. Молекулярно-биохимические критерии оценки свойств эндофитных бактерий при создании комплексных микробиологических препаратов / [Электронный ресурс] — Режим доступа. — URL: <http://ati-agro.ru/microbiology/extrasol/nauchno-ob-ekstrasole/molekuljarno-biohimicheskie-kriterii-ocenki-svoystv> (дата обращения: 21.04.2018).
5. Садыкова, А. Ж. Генетические основы селекции ферментационных дрожжей *Saccharomyces* и *Kluuveromyces* дис. ... канд. биол. наук : 03.02.07 / Садыкова Айгуль Жомартовна. – Москва, 2016. – 150 с.
6. Новиков, Д. К. Медицинская микробиология : учебник / Д. К. Новиков, И. И. Генералов, Н. М. Данющенко – Витебск : Витебский государственный медицинской университет, 2010. – 597 с.
7. Бочков, Н. П. Клиническая генетика : учебник / Н. П. Бочков, В. П. Пузырев, С. А. Смирнихина – Москва : Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова, 2011. – 592 с.

8. Скворцова, Н. Н. Основы молекулярной биологии : учеб. пособие / Н. Н. Скворцова. – Санкт-Петербург : Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 2015. – 74 с.

9. Newsletter Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service. Introduction to the Microbiology of Food Processing. – Введ. 01.08.2012 USA : 2012. – 64 p.

10. Primrose, S. B. Principles of Gene Manipulation and Genomics : научная статья / S. B. Primrose, R. M. Twyman – USA: TJ International, 2006. – 667 p.

11. O'Brien, S. The evolution of bacterial mutation rates under simultaneous selection by interspecific and social parasitism / S. O'Brien , A. M. Rodrigues, A. Buckling // Royal Society.– UK : University of Exeter, University of Oxford, 2013. – P. 1-7.

11. Царенко, Т. М. Микробиология с основами вирусологии : учебное пособие / Т. М. Царенко – Витебск : Витебский государственный медицинский университет, 2004. – 176 с.

12. Кребс, Д. Гены по Льюису: науч. изд. пер. 10-го англ. изд. / Д. Кребс, Э. Голдштейн, С. Килпатрик — Москва : Лаборатория знаний, 2017. — 919 с.

13. Стручкова, И. В. Регуляция биосинтеза белка : учебник / И. В. Стручкова, А. А. Брилкина, А. П. Веселов. – Нижний Новгород : Нижегородский университет им. Н.И. Лобачевского, 2010. — 100 с.

14. Sridhar Rao, P. N. Bacterial genetics : scientific publication / P. N. Sridhar Rao – India : Medical College Davangere, 2006. – 110 с.

15. Kingery, K. Screening the dark genome for disease / K. Kingery // Nature Biotechnology. – USA : Duke University, – 2017.–№ 4. – P. 39.

16. Клименко, А. Е. Идентификация коллекционных культур бактерий современными масс-спектр. и молекулярно-генетическими методами : ВКР ... бакалавр спец. «Биология» : 06.03.01 – Краснодар, 2015. – 56 с.
17. Лысак, В.В. Микробиология : учеб. пособие / В. В. Лысак. – Минск : БГУ, 2005. – 261 с.
18. Gurdeep, R. Molecular Techniques to Assess Microbial / Gurdeep Rastogi, Rajesh K. Sani // *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications Community Structure, Function and Dynamics in the Environment Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function and Dynamics in the Environment.* - 2011. – Chapter 2. – P. 29-57.
19. Стародумова, И. П. Развитие системы классификации актинобактерий рода *Rathayibacter* : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03 / Стародумова Ирина Павловна. – Москва, 2018. – 150 с.
20. Турова, Т. П. Применение методов геносистематики для решения вопросов таксономии и изучения биоразнообразия прокариот : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.07 / Турова Татьяна Павловна. – Москва, 2009. – 86 с.
21. Гусев, М. В., Минеева Л. А. Микробиология: учебник 4-е изд. / М. В. Гусев, Л. А. Минеева — Москва: Изд-во МГУ, 2004. – 448 с.
22. Медицинская микробиология: учеб. пособие / Д. К. Новиков, И. И. Генералов, Н. М. Данющенко и др.- Витебск, 2010.– 584 с.
23. Брянская, А. В. Коллекция микроорганизмов ИЦиГ СО РАН как генетический ресурс для биотехнологии / А. В. Брянская // Вавиловский журнал генетики и селекции / ИЦиГ СО РАН, ИГМ СО РАН, ИК СО РАН. - Новосибирск, 2017. – Т. 21, № 6. – С. 631-637.

24. Садунова, А. В. Общая характеристика бактерий рода *Bacillus* : учебное пособие / А. В. Садунова. – Владивосток : Дальневосточный федеральный университет, 2013. – 66 с.

25. Медведев, А. П. Генетика микроорганизмов: уч.- мет. пособие для студентов факультета ветеринарной медицины / А. П. Медведев, А. А. Вербицкий, Ю. И. Шапиро. – Витебск : УО ВГАВМ, 2004. – 108 с.

26. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики: научное издание / Д. А. Васильев, А. И. Калдыркаев, Н. А. Феоктистова, А. В. Алёшкин. – Ульяновск : НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – 98 с.

27. Edward J. / FSANZ Agents of Foodborne Illness. 2nd ed, Food Standards Australia New Zealand, Canberra, 2013. [электронный ресурс] - режим доступа: http://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/FSANZ_FoodborneIllness_2013_WEB.pdf

28. FSANZ Agents of Foodborne Illness. 2nd ed, Food Standards Australia. – Introduced 06.2013. – Australia : New Zealand, 2013. – 120 с.

29. Гатауллин А. Г. Биологические свойства штаммов *Bacillus subtilis*, перспективных для создания новых пробиотиков : дис. ... д-ра биол. наук Гатауллин Айрат Гафуанович. – Москва, 2005. – 131 с.

30. Разработка тест-системы генотипирования лактобактерий на основе полимеразной цепной реакции с целью видовой идентификации штаммов: отчет о НИР / Н. О. Терещенко, К. В. Беспоместных – Кемерово : Кемеровский государственный сельскохозяйственный институт, 2008. – 8 с.

31. Никитин И. Д. Обзор протеома бактерии *Bacillus Amyloliquefaciens* MBE128 / Никитин И. Д. - Москва: МГУ, 2017. – 3 с.

32. Wu, L. Bacilysin overproduction in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 markerless derivative strains FZBREP and FZBSPA enhances antibacterial activity / L. Wu, H. Wu, L. Chen, L. Ling and others // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – № 99. – P. 11.

33. Grube, M. The plant microbiome and its importance for plant and human health / M. Grube, M. Schloter, K. Smalla, G. Berg // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – № 10. – P. 117–124.

34. Chen, L. Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 / L. Chen, L. Yunpeng; W. Gengwei; V. Njeri // *Physiologia Plantarum*. – 2016. Vol. 1, № 158, P. 34–44.

35. Qiu, M. Comparative proteomics analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 revealed the key proteins involved in in situ root colonization / Meihua Qiu, Zihui Xu, Xingxing Li and others. // *Journal of Proteome Research*. - 2014. – № 13. – P. 81-91

36. Chen, L. Rapid Sanger sequencing of the 16S rRNA gene for identification of some common pathogens / L. Chen, Y. Cai, G. Zhou, X. Shi and others // *PloS one*. – 2014. – Vol. 9, №. 2. – P. 8.

37. Ботина, С. Г. Идентификация промышленных штаммов молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического типирования / С. Г. Ботина // *Генетика*. – 2006. – Т. 42, № 12. – С. 1621-1635.

38. Точилина, А. Г. Индикация и идентификация бактерий рода *Lactobacillus* с использованием полимеразной цепной реакции / А. Г. Точилина // *Микробиология, эпидемиология и иммунобиология*. – 2008, – № 3. – С. 69-73.

39. Джобулаева, А. К. Молекулярно-генетическая идентификация двух штаммов молочнокислых бактерий на основе анализа нуклеотидных

последовательностей 16s rRNA гена / А. К.Джобулаева // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 8. – С. 63-67.

40. Алексеева А. Е. Возможности и перспективы применения методов массивного параллельного секвенирования в диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями [Электронный ресурс] / А. Е. Алексеева, Н. Ф. Бруснигина // Медиаль – Аналитический обзор. – 2014. – Т. 2, № 12. – Режим доступа: www.medial-journal.ru. (дата обращения: 04.05.2018).

41. GenBank [Электронный ресурс] : база данных – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. (дата обращения: 04.05.2018).

42. Лопухов, Л. В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике / Л. В. Лопухов, М. В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – Казань ; Смоленск, 2000. – Т. 2. – С. 96-106.

43. Хайруллина Е.В. Полимеразная цепная реакция // Материалы X Международной студенческой электронной научной конференции «Студенческий научный форум» – [Электронный ресурс] : Режим доступа : <http://www.scienceforum.ru/2018/3105/3960>. (дата обращения: 01.05.2018).

44. Основы полимеразной цепной реакции методическое пособие ДНК-технология. – Москва, – 2012. [Электронный ресурс] : Режим доступа : www.dna-technology.ru. (дата обращения: 01.05.2018).

45. Пехов, А. П. Биология с основами экологии : учебник для вузов / А. П. Пехов. — СПб.: Изд-во Лань, 2000. — 672 с.

46. Великов, В. А. Молекулярная биология : учеб. пособие для студ. биол. специальностей / В. А. Великов.- Саратов: Изд-во Сарат. источник, 2013. – 85 с.
47. Биотехнология – [Электронный ресурс] : Рестрикция - Режим доступа : http://www.biotechnolog.ru/ge/ge2_2.htm. (дата обращения: 02.05.2018).
48. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование : практическое пособие / Л. А. Остерман. - Москва: Наука, 1981. – 288 с.
49. Лагодич, А. В. Методы анализа нуклеиновых кислот : учеб.-метод. пособие для студентов биол. фак. / А. В. Лагодич, О. В. Лагодич. – Минск: БГУ, 2013 – 47 с.
50. Бондарева, О. С. Современные подходы к генотипированию возбудителей особо опасных инфекций / О. С. Бондарева // Эпидемиология и инфекционные болезни. – Волгоград – 2014. - № 1. - С. 34-44.
51. Каюмов, А. Р. Молекулярный анализ генома : учебно-методическое пособие / А. Р. Каюмов. – Казань: КФУ, 2016. – 60 с.
52. Патрушев Л. И. Экспрессия генов : науч. изд. / Л. И. Петрушев. – Москва, 2000. – 830 с.
53. Афонников, Д. А. Системная биология / Д. А. Афонников, В. В. Миронова // Вавиловский журнал генетт. и селекции, Н-рск - 2014.- Т. 18, № 1.
54. История и перспективы компьютерного конструирования лекарств : отчет о НИР / А. А. Глушко. – Пятигорск, 2010. – 23 с.
55. Food for Thought ... on *In Silico* Methods in Toxicology : отчет / T. Hartung, S. Hoffmann. – USA : Johns Hopkins University, 2009. – 12 с.
56. Выделение ДНК [Электронный ресурс] – Режим доступа http://medprom.ru/medprom/mpp_0000367. (дата обращения: 29.05.2018)

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Ниже представлены электрофореграммы на которых не выявлены бактерии рода *Vacillus* среди предоставленных 11 образцов бактерий.



Рисунок 16 –
Электрофоретическое
разделение после
обработки рестриктазой
Taq I
M - ДНК Маркер 100pb
1 - Образец 5
2 - Образец 10
3 - Образец 9
4 - Образец 9
5 - Образец 6
6 - Образец 7

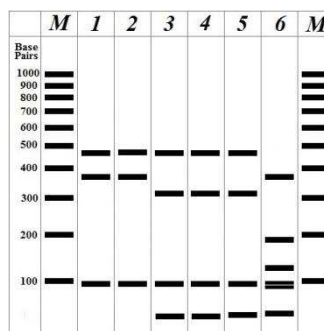


Рисунок 17 -
Теоретически
рассчитанные
картины
электрофоретического
разделения для
рестриктазы Taq I
M – ДНКМаркер100pb
1 - *Arthrobacter
globiformis*
2 - *Achromobacter
xylooxidans*
3 - *Roseovarius tolerans*
4 - *Roseovarius tolerans*
5 - *Agrobacterium
tumefaciens*
6 – *Klebsiella p.*

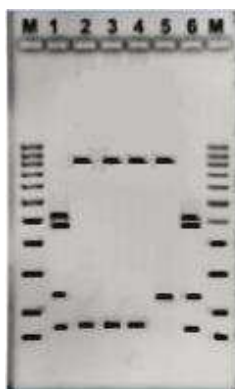


Рисунок 18 –
Электрофоретическое
разделение после
обработки рестриктазой
Mbo I
M – ДНК
Маркер100+50pb
1 - Образец 5
2 - Образец 10
3 - Образец 10
4 – Образец 11
5 - Образец 8
6 - Образец 9

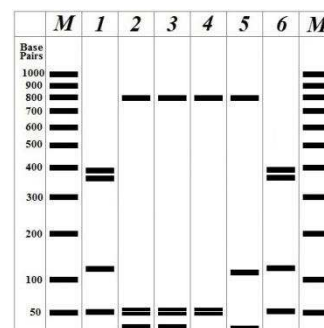


Рисунок 19 -
Теоретически
рассчитанные картины
электрофоретического
разделения для
рестриктазы Mbo I
M –
ДНКМаркер100+50pb
1 - *Arthrobacter
globiformis*
2 - *Achromobacter
xylooxidans*
3 - *Achromobacter
xylooxidans*
4 - *Ralstonia eutropha*
5 - *Pseudomonas
fluorescens*
6 - *Roseovarius
tolerans*

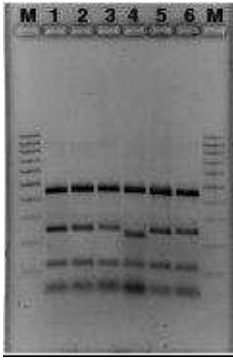


Рисунок 20 – Электрофоретическое разделение после обработки рестриктазой Sse9 I

М – ДНК Маркер 100pb

- 1 - Образец 9
- 2 - Образец 5
- 3 - Образец 8
- 4 - Образец 6
- 5 - Образец 10
- 6 - Образец 10

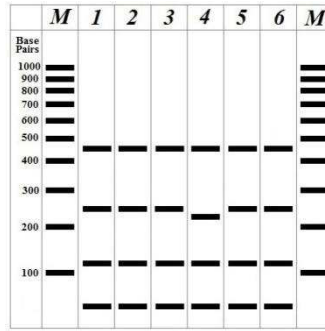


Рисунок 21 – Теоретически рассчитанные картины электрофоретического разделения для рестриктазы Sse9 I

М – ДНК Маркер 100pb

- 1 - *Roseovariustolerans*
- 2 - *Arthrobacter globiformis*
- 3 - *Pseudomonas fluorescens*
- 4 - *Agrobacterium tumefaciens*
- 5 - *Agrobacterium xylosoxidans*
- 6 - *Achromobacter xylosoxidans*

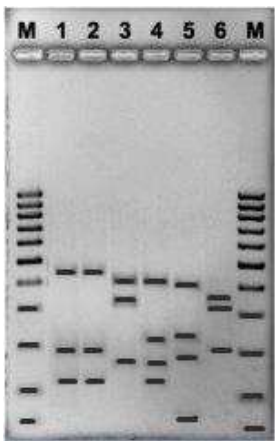


Рисунок 22 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации после обработки рестриктазой Hae III

М – Маркер 100 bp+50 bp

- 1 – Образец 6
- 2 – Образец 6
- 3 – Образец 9
- 4 – Образец 5
- 5 – Образец 8
- 6 – Образец 10

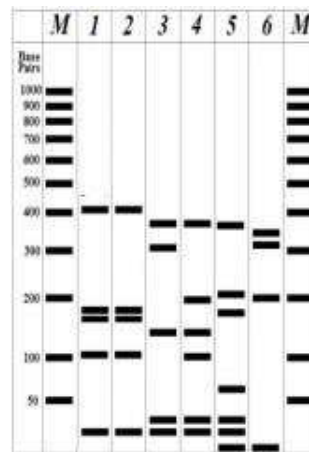


Рисунок 23 - Теоретически рассчитанные картины электрофоретического разделения продуктов амплификации после обработки рестриктазой Hae III

М – Маркер 100 bp+50 bp

- 1-*Agrobacterium tumefaciens*
- 2-*Agrobacterium tumefaciens*
- 3 - *Roseovarius tolerans*
- 4-*Arthrobacter globiformis*
- 5-*Pseudomonas fluorescens*
- 6-*Achromobacter xylosoxidans*

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой
Шлисс Е. И. Шишацкая

« 19 » июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

«Идентификация бактерий видов *B. cereus*, *B. pumilus* и *B. amyloliquefaciens*
анализом сиквенса гена 16S рРНК»

Научный руководитель

Аур

доцент, к.б.н.

О. А. Гусейнов

Выпускник

Казю

А. А. Казютина

Красноярск 2018