

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

Сравнение вариантов метода анализа ПДРФ гена 16S рРНК с использованием
пар праймеров 500L – 1350R и 8F – 1492R

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

Выпускник _____ И.Е. Маслюкова

Красноярск 2018

Оглавление

Введение	3
1 Обзор литературы	5
1.1 Бактерии рода <i>Pseudomonas</i>	5
1.2 Бактерии рода <i>Bacillus</i>	6
1.3 Бактерии родов <i>Achromobacter</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> и <i>Agrobacterium</i>	7
1.4 Ген 16s рРНК	8
1.5 Полимеразная цепная реакция	9
1.6 Электрофорез	9
1.7 Рестрикция	10
1.8 ПДРФ-анализ	12
2 Материалы и методы	13
2.1 Объекты идентификации	13
2.2 Методика проведения амплификации и рестрикции <i>in silico</i>	13
2.3 Методика выделения ДНК	14
2.4 Проведение электрофореза.....	14
2.5 Проведение ПЦР	15
2.6 Проведение реакции рестрикции.....	16
3 Результаты.....	17
3.1 Проведение реакции рестрикции <i>in silico</i>	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Выделение ДНК.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Получение ампликонов.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Проведение реакции рестрикции.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных	Ошибка! Закладка не определена.
Заключение.....	Ошибка! Закладка не определена.
Список литературы	18
Приложение - А	21
Таблица 1 – Рестрикционный анализ ампликонов 500L-1350R	21
Таблица 2 – Рестрикционный анализ ампликонов 8F-1492R	23
Приложение - Б	25
Таблица 3 - концентрация и чистота полученной ДНК	25

Введение

На протяжении всей нашей жизни мы неоднократно сталкиваемся с существами невидимыми нашему глазу. Бактерии являются неотъемлемой частью этой большой группы. Они покорили все среды обитания, приспособились ко всем существующим условиям окружающей среды, в том числе к самым экстремальным. Они стали постоянными соседями других форм жизни, правда, не всегда хорошими. Бактерии способны влиять на другие организмы как положительно, являясь симбионтами, так и отрицательно, становясь паразитами. Есть и представители, которые не зависят от чужого существования. Но и они способны нанести косвенный вред.

Человек научился использовать бактерий во многих сферах деятельности. От производства продуктов, до лабораторных исследований и фармакологии. Бактерий применяют в очистке от нефтяных загрязнений, при удобрении почв. Все эти задачи будут успешно выполняться при правильном определении видовой принадлежности того или иного микроорганизма.

Идентификация бактерий возможна разными методами: микробиологическими, биохимическими, молекулярно-генетическими. В данной работе был использован метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Чаще всего для анализа используются гены 16S и 23S рРНК, что обусловлено их присутствием во всех бактериальных клетках и их родовой специфичностью. Ген 16S предпочтителен тем, что он имеет небольшой размер, достаточно вариабелен, и по нему уже имеется большая база данных.

Актуальность работы

Не всегда при определении вида бактерий можно обойтись одной парой праймеров и одной рестриктазой. При близком родстве многие виды бактерий будут иметь одинаковые рестрикционные профили для некоторых

эндонуклеаз рестрикции, что потребует применения дополнительных рестриктаз. А это в свою очередь приведет к дополнительным материальным затратам и потере времени. Поэтому важно провести предварительный анализ *in silico*, для поиска оптимального сочетания размеров ампликонов и применяемых рестриктаз.

Цель

Сравнить варианты метода анализа ПДРФ гена 16S рРНК с использованием пар праймеров 500L – 1350R и 8F – 1492R при идентификации почвенных бактерий.

Задачи

1. Провести анализ ПДРФ ампликонов 500L – 1350R и 8F – 1492R гена 16S рРНК массива наиболее распространенных почвенных бактерий с использованием данных GenBank *in silico* и построить теоретические электрофореграммы с помощью программы pDRAW32, выявить наиболее эффективные рестриктазы.

2. Выделить ДНК из предоставленных образцов биомассы почвенных бактерий. Проанализировать качество полученных образцов ДНК спектрофотометрическим методом и методом электрофореза в агарозном геле.

3. Провести амплификацию полученной ДНК с использованием пар праймеров 500L и 1350R, 8F и 1492R, проанализировать качество полученных ампликонов методом электрофореза в агарозном геле.

4. Для полученных ампликонов провести реакции рестрикции, провести электрофорез продуктов гидролиза в агарозном геле и оформить полученные электрофореграммы с использованием гель-документирующей системы.

5. Сравнить теоретические и практические электрофореграммы, идентифицировать исследуемые образцы, выяснить эффективность рестриктаз для ампликонов 500L – 1350R и 8F – 1492R при идентификации этих бактерий.

1 Обзор литературы

1.1 Бактерии рода *Pseudomonas*

Pseudomonas – это представители грамотрицательных гамма-протеобактерий, являются облигатными аэробами, широко распространены в различных средах [1]. *Pseudomonas* является одним из самых разнообразных родов.

Свое название *P. fluorescens* получили из-за секреции флуоресцирующего пигмента пиовердина.

P. fluorescens живут при температуре 25-30 градусов по Цельсию, при этом выдерживая низкие температуры до 4 градусов. Бактерии неприхотливы к среде, быстро растут, что позволяет легко их культивировать, что делает все производства вокруг этих бактерий весьма экономичными [2].

Некоторые штаммы *P. fluorescens* конкурируют с фитопатогенами за ткани растений и вырабатывают антибиотики, что приводит к подавлению заболеваний растений, вызываемые этими фитопатогенами. При этом эти бактерии стимулируют рост растений. *P. fluorescens* также имеют токсины против насекомых-вредителей. Тем самым *P. fluorescens* можно использовать в сельском хозяйстве [3].

Антибиотик Мупироцин, вырабатываемый *P. fluorescens* используется для лечения инфекций человека, в особенности против *Staphylococcus aureus*. По этой причине именно *P. fluorescens* используют как основной источник этого антибиотика в промышленных масштабах.

P. fluorescens не являются сильными патогенами для человека. Но ими можно заразиться при иммунодефиците.

Получен штамм *P. fluorescens*, способный продуцировать витамин В₁₂ в больших количествах (в 3 раза), чем известные ранее штаммы метанообразующих и пропионокислых бактерий [4]. Другой штамм способен с высокой скоростью осуществлять разложение стирола и

этилбензола, которые применяются при производстве полистирола и бутандиенстирольного каучука [5].

1.2 Бактерии рода *Bacillus*

По современным представлениям, аэробные спорообразующие бактерии, объединяют в отдельный род *Bacillus* семейства *Bacillaceae*[6]. Особенностями бактерий рода *Bacillus*, в отличии от других представителей семейства *Bacillaceae*, являются: строгая или факультативная аэробная природа, палочковидная форма и продукция каталазы.

Родовое название *Bacillus* введено в 1872 г. Фердинандом Коном для палочковидных бактерий, растущих в виде нитей. Большинство видов *Bacillus* - типичные хемоорганотрофы. Они не нуждаются в факторах роста и способны ассимилировать минеральные формы азота в качестве единственного его источника [7].

Главной средой обитания бактерий является почва - штаммы этих бактерий были выделены даже из образцов почвы, находящихся в экстремальных условиях - в пустыне и в Антарктике. Обычно разнообразие бактерий в почвах с низким содержанием органических веществ достаточно ограничено. В них доминируют *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. cereus*. Однако по мере повышения плодородия почвы разнообразие видов увеличивается. *Bacillus*, обнаруженные в пресной воде, в основном имеют почвенное происхождение [8].

За исключением *B. anthracis*, *Bacillus* не обладают большой патогенностью для млекопитающих.

Бактерии рода *Bacillus* рассматриваются как перспективные агенты биологического контроля болезней растений благодаря их широко распространенного природного антагонизма ко многим фитопатогенным грибам. Не достаточно исследованы воздействия антибиотиков, производимых *Bacillus* различной видовой принадлежности на характер воздействия на фитопатогенные грибы.

Как показывают исследования, биодеструкторами различных высокомолекулярных соединений также являются бактерии рода *Bacillus*.[9].

1.3 Бактерии родов *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Arthrobacter* и *Agrobacterium*

Представители рода *Achromobacter* - это грамотричательные аэробные бактерии. Обитают в основном во влажных средах – в воде и почве. Хорошо растут на агаре. Многие штаммы обычно устойчивы к ряду антибиотиков. *Achromobacter Xylosoxidans* первоначально был выделен у больных с отитом [10].

Micrococcus - грамположительные бактерии сферической формы, расположенные в парах, тетрадах и скоплениях неправильной формы. Являются облигатными аэробами, хеморганотрофы. Растут на простых средах и устойчивы к лизостафину. Встречается в основном на коже млекопитающих и в почве [11].

Arthrobacter globiformis является типичным представителем рода. Грамположительные неспорообразующие аэробные палочки. По мере роста распадаются на мелкие кокки. Хеморганотрофы. Растут на простых средах с биотином. Метаболизм окислительного типа. Оптимум температур 25-30 градусов по Цельсию. Широко распространены, обитают преимущественно в почве.

Бактерии рода *Agrobacterium* не образуют спор. Грамотричательные аэробные бактерии. Некоторые штаммы способны к анаэробному дыханию в присутствии нитратов. Оптимальная температура 25-28 градусов по Цельсию. Способны расти в тканях растений, проникая через поврежденные участки, вызывая трансформацию растительных клеток в автономно пролифирирующие опухолевые клетки. Круг хозяев обширен. Растут на средах с углеводами с образованием внеклеточной полисахаридной слизи. Хемоорганотрофы. Местом обитания типового представителя рода - *Agrobacterium Tumefaciens* - служит почва, куда попадал ранее пораженный растительный материал [7]

1.4 Ген 16S рРНК

Геномы прокариот даже в пределах одного вида являются динамичными структурами. Существуют понятия базового и вспомогательного генома, которые сложились исходя из внутривидовой вариабельности. Консервативные участки включают гены, ответственные за информационные системы репликации, транскрипции, трансляции, ключевые пути метаболизма и формирования клеточных структур, определяющих видовую и родовую принадлежность. Вспомогательными участками являются операционные гены, контролирующие разные процессы метаболизма и морфофизиологические признаки, обеспечивающие приспособленность к определенной экологической нише. Многие такие гены локализованы в плазмidaх [12].

Ген 16S рибосомальной РНК является самым используемым маркерным геном бактерий для их идентификации. 16S-рРНК входит в состав малой 30S субъединицы рибосом прокариот. Ген 16S-рРНК несет как консервативные, так и вариабельные участки нуклеотидной последовательности [13]. Сиквенс этих последовательностей и используют как для определения рода, так и видовой идентификации микроорганизмов. Консервативные участки в основном идентичны у всех бактерий, а вариабельные участки можно использовать для идентификации бактерий [14,15].

Ген 16S рРНК можно использовать для оценки эволюционных отношений между бактериями, потому что он эволюционирует медленно, а его продукт жизненно необходим и поэтому функционально консервативен. Внутри одного вида сходство гена 16S-рРНК может достигать 98–99% [16]

Огромная база нуклеотидных последовательностей гена 16S-рРНК для большого количества бактерий позволяет сравнивать полученные последовательности с уже имеющимися, что позволяет идентифицировать микроорганизмы [17,18].

1.5 Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция – метод, позволяющий добиться значительного увеличения копий определенного фрагмента ДНК в биоматериале. Метод был изобретен Кэрри Маллисом в 1983 году [19].

Аналогично репликации в живой клетке, при ПЦР копирование ДНК осуществляется ДНК-полимеразой. Полимераза, двигаясь по одиночной цепи ДНК, начинает присоединять нуклеотиды к олигонуклеотидным праймерам, тем самым синтезируя комплементарную ей последовательность ДНК [20]. Специфичность ПЦР определяется способностью праймеров «узнавать» строго определенный участок ДНК и связываться с ним по правилу комплементарности [21].

На практике ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок.

ПЦР состоит из многократно повторяющихся 25-35 циклов амплификации, каждый из которых включает три этапа: денатурация (расплетение, плавление) двухцепочечных фрагментов ДНК, «отжиг» (присоединение, гибридизация) праймеров к матрице и элонгация (удлинение праймеров).

1.6 Электрофорез

Частицы биологических макромолекул несут электрический заряд, благодаря наличию групп, способных к электролитической диссоциации. Под действием электрического поля зарженные частицы перемещаются к катоду или аноду. Такое явление носит название электрофореза.

В форме геля агар содержит поры различных размеров, диаметр которых зависит от концентрации. Такой гель представляет собой молекулярное сито. Лишь крупные молекулы, как ДНК и РНК, разделяются в агарозном геле в соответствии с их размерами. Обычно используют гели с концентрацией 1,25-2,5%. На разделение нуклеиновых кислот в агарозном

геле помимо молекулярной массы влияют концентрация агарозы, конформация ДНК, напряженность электрического поля [22].

Специфической особенностью разделения нуклеиновых кислот в агарозном геле является необходимость использовать разбавленные буферы и проводить длительное разделение.

Нуклеиновые кислоты интенсивно поглощают ультрафиолетовый свет, поэтому их можно обнаружить с помощью сканирования в УФ-свете. Обычно для локализации полос разделения нуклеиновых кислот используют специфические красители [23].

1.7 Рестрикция

Эндонуклеазы рестрикции (или рестриктазы) – группа ферментов класса гидролаз, катализирующие гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных ДНК в большинстве прокариотических и некоторых других организмах. Ферменты находят определенные последовательности нуклеотидов, называемые сайтами рестрикции, в ДНК чужеродной клетки и разрушают молекулу ДНК в этих участках [24]. Вместе с метилазами они образуют систему рестрикции и модификации в клетке.

Первые рестрикционные эндонуклеазы были выделены в 1968г. из штаммов *E. coli B* и *E. coli K*. Из различных штаммов микроорганизмов были выделены ферменты рестрикции, различающиеся между собой по структурной организации, потребностям к кофакторам и особенностям субстратной специфичности [25].

Рестриктазы всех типов отличаются исключительно высокой субстратной специфичностью – каждая узнает последовательность нуклеотидов строго определенной длины и состава. Основное различие между ними заключается в характере расщепления субстрата.

Самыми распространенными в молекулярных методах являются эндонуклеазы рестрикции II типа. Их сайты узнавания состоят из 4-8 нуклеотидных пар, а сами ферменты полностью гидролизируют ДНК [26].

На данный момент выделено более трех тысяч эндонуклеаз рестрикции. Более шестисот рестриктаз доступны в виде коммерческих препаратов и повседневно используются в лабораториях для модификации ДНК и решения генно-инженерных задач [24].

Ферменты рестрикции являются эффективным инструментом исследования. Они позволяют делить молекулы ДНК очень большого размера на фрагменты длиной от нескольких сотен до нескольких тысяч оснований. Но при слабой активности рестриктаз или при коротком промежутке времени рестрикции может происходить так называемая неполная (частичная) рестрикция, в результате чего образуются фрагменты большей длины, чем при полном расщеплении [26].

Фрагменты ДНК разной длины можно легко разделить с помощью метода электрофореза в агарозном геле.

Короткие фрагменты мигрируют намного быстрее, чем длинные. При окрашивании гелей красителями, связывающимися с ДНК, выявляется набор полос, каждая из которых отвечает рестрикционному фрагменту, молекулярную массу которого можно определить, проведя калибровку с помощью ДНК-маркеров.

Рестриктазы синтезируются разными бактериями, но чтобы не возиться с большим количеством разнообразных сред и подбором оптимума температуры и pH, часто клонируют гены рестриктаз в *E. Coli*.

Для каждого фермента рестрикции существуют оптимальные условия реакции, которые приводятся в описании, прилагаемом фирмой-изготовителем [27]. Основные переменные параметры – это температура инкубации и состав буфера. К температурному режиму предъявляются достаточно жесткие требования, тогда как различия между буферами чаще всего бывают лишь незначительны.

1.8 ПДРФ-анализ

Наличие сайтов рестрикции в геномной ДНК и их взаимное расположение однозначно определяются последовательностью нуклеотидов исследуемой ДНК, поскольку сам сайт рестрикции - не что иное, как строго определенная последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая и расщепляемая рестриктазами.

Две молекулы ДНК будут разрезаны на фрагменты одинаковой длины, если молекулы идентичны. Но если в одной молекуле есть сайт рестрикции, а другой нет, то фрагменты будут различной длины. Если в одной молекуле будет больше или меньше пар оснований до сайта рестрикции, чем в другой, то фрагменты также будут различными и т.д. Это явление носит название полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ДНК (ПДРФ, англ. restriction fragment length polymorphism, RFLP).

На практике это означает, что, разрезая эндонуклеазами рестрикции часть генома представителей разных видов, можно получить фрагменты различной длины, в зависимости от строения проверяемой части генома индивидуума, а, следовательно, возможна их идентификация. Полное совпадение рестрикционных картин по нескольким рестриктазам указывает на близкородственность данных штаммов [28].

Несмотря на то, что секвенирование ДНК может определить последовательность более точно, ПДРФ был разработан как первый и дешевый метод для массового применения. Цена анализа зависит только от цены рестриктазы, не требует высокой квалификации персонала и дорогостоящего оборудования, всем необходимым оснащена любая ПЦР-лаборатория, занимающаяся, например, диагностикой инфекций, возможно генотипирование единичных образцов ДНК.

2 Материалы и методы

2.1 Объекты идентификации

Образцы биомассы почвенных бактерий были предоставлены Ольгой Кондратенко, магистрантом кафедры биотехнологии из группы индийского исследователя Саеда Бакера.

Образцы бактерий *Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus siamensis*, *Roseovarius tolerans*, *Klebsiella pneumonia*, использовались в работе в качестве маркеров для более точного определения длин фрагментов рестрикции исследуемых образцов.

2.2 Методика проведения амплификации и рестрикции *in silico*

In silico — это латинское фраза, которая употребляется в значении «сделано с помощью компьютера или с помощью компьютерной симуляции». Фразу стали употреблять по аналогии с *in vivo* или *in vitro*, которые широко используются в биологии. Латыни *in silico* ничего не значит; это искусственно созданная фраза.

Фраза «*in silico*» употребима только в случаях, когда с помощью компьютера создают модели процессов, происходящих в природе или в лабораторных условиях. Это относится ко всем естественным наукам. Но в других случаях фразы «компьютерные расчеты» и «*in silico*» не тождественны [29].

Виртуальная полимеразная цепная реакция (ПЦР *in silico*, цифровая ПЦР, электронная ПЦР, е-ПЦР) — математический метод компьютерного анализа теоретической полимеразной цепной реакции, использующий данные о нуклеотидных последовательностях праймеров (или ДНК-зондов) для предсказания амплификации фрагментов генома, хромосомы, или другого участка ДНК

Из Gen Bank [30] берут последовательности гена. Виртуально получают ампликоны, используя соответствующие праймеры. Данные

заносят в программу для ДНК анализа pDRAW32 [31]. В ней для проведения рестрикции выбирают нужные рестрикты из базы данных программы. Данные о фрагментах рестрикции может быть представлена в графическом и текстовом виде. Далее для проведения виртуального гель-электрофореза выбирают маркер и концентрацию геля. Программа представляет виртуальные электрофореграммы для каждой рестрикты.

2.3 Методика выделения ДНК

Бактериальную геномную ДНК выделяют при помощи набора *SILICA uni* согласно приложенной инструкции. Метод выделения основан на эффективном выходе геномной ДНК за счет лизирующего раствора. ДНК находится в верхней фазе. Затем верхнюю фазу с ДНК переносят в новые пробирку и добавляют к ней суспензию сорбента, с которым она связывается, перемешивают и оставляют на некоторое время, далее центрифугируют. Убирают супернатант. Встряхивают на вортексе и центрифугируют один раз после добавления отмывочного раствора №1 и два раза после раствора №2, каждый раз снимая надосадочную жидкость перед добавлением следующего раствора. Очищенная бактериальная ДНК в осадке сушат в термостате и элюируют элюирующим раствором, затем вновь термостатируют. Содержимое пробирок встряхивают на вортексе, центрифугируют. Супернатант с ДНК переносят в чистые пробирки.

2.4 Проведение электрофореза

В форму для агарозы устанавливают гребенку. 0,85 г агарозы смешивают с 50 мл буфера ТБЕ, полученную смесь (1,7%) нагревают 1 минуту в СВЧ-печи до образования равномерной суспензии. Полученную суспензию охлаждают и заливают в форму. Гель оставляют на 30 минут для застывания. После того как гель затвердел, гребенку извлекают и подложку с гелем перемещают в электрофорезную камеру (Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad). В лунки наносят заранее приготовленные в планшете пробы ДНК и по бокам

ДНК Маркеры. Далее гель заливают ТБЕ буфером до метки. Электрофорезную камеру закрывают и присоединяют электроды к источнику напряжения (Bio-Rad PowerPac HV). Электрофорез проходит в течение 1,5-2 часов в соответствии с напряженностью 70-100В. По окончанию разделения подложку с гелем вынимают и помещают в красящий раствор бромистого этидия (1 мкг/мл). После 30 мин. подложку вместе с гелем промывают в дистиллированной воде. После гель помещают в трансиллюминатор под ультрафиолет гель-документирующей системы (Bio-Rad Gel Doc XR) и получают электрофорограммы образцов.

2.5 Проведение ПЦР

Для проведения реакции ПЦР требуются дистиллированная вода, 10-кратный буфер, dNTP, праймеры (500L и 1350R – для ампликонов размеров 900 п.о., 8F и 1492R – 1500 п.о.), MgCl₂, образцы выделенной ДНК, Hot start ДНК-полимераза (сибэнзим). Все компоненты, кроме образцов смешивают в одной пробирке. Затем в разные пробирки добавляют данную смесь, а также разные образцы ДНК. Далее пробы помещают в амплификатор Bio-rad – MJ Mini Personal Thermal Cycler. ПЦР проходит в соответствии с программой:

1. 95°C – 4:00;
2. 95°C – 0:16;
3. 58°C – 0:22;
4. 72°C – 1:55;
5. GO TO 2 36 times;
6. 72°C – 6:30;
7. 4°C – 18:00:00;
8. END

Далее полученные ампликоны подвергают электрофорезу.

Hot Start Taq ДНК-полимераза [19] - сложной смесь термостабильной Taq ДНК-полимеразы молекулярной массой 94 kD (из рекомбинантного штамма *E.coli* экспрессирующего ген ДНК-полимеразы из *Thermus aquaticus* YT1) и специфических моноклональных антител. Hot Start Taq полимераза неактивна в условиях приготовления реакции амплификации. Это позволяет исключать ошибочное праймирование на стадии подготовки. Hot Start Taq не нужно нагревать для активации фермента. Неактивный комплекс Hot Start Taq диссоциирует автоматически при повышении температуры выше + 70 °C, приводя к активации ДНК-полимеразы.

2.6 Проведение реакции рестрикции

Для проведения реакции рестрикции требуются дистиллированная вода, буфер (для каждой рестриктазы свой), бычий сывороточный альбумин BSA, рестриктаза. В отдельные пробирки добавляют данную смесь и ампликоны образцов. Пробы помещают в термостат *Eppendorf – ThermoStat plus* на 6 часов. Температура для каждой рестриктазы своя. После продукты рестрикции подвергают электрофорезу для визуализации результатов.

3 Результаты

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

Список литературы

1. Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex [Электронный ресурс] / Daniel Garrido-Sanz, Jan P. Meier-Kolthoff, Markus Göker, Marta Martín, Rafael Rivilla, Miguel Redondo-Nieto // PLOS. – 2016. – Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0150183>.
2. *Pseudomonas fluorescens* [Электронный ресурс] / Morgan Boresi //Missouri University of Science and Technology. – 2009. – Режим доступа: http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2009/P_fluorescens.html.
3. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads / Dieter Haas & Geneviève Défago // Nature Reviews Microbiology. – 2005. – №1. – Р. 307-319.
4. Пат. 2180001 Российская Федерация, МПК C12N1/20, C12P19/42, C12P19/42, C12R1:39. Штамм бактерий *Pseudomonas fluopescens* ВКМ В-2224Д – продуцент витамина В₁₂ / А. И. Пахтуев Ф. Н. Чегодаев ; заявитель и патенто-обладатель Бердский завод биологических препаратов. – №2000103571/13 ; заявл. 15.02.00 ; опубл. 27.02.02.
5. Пат. 2067115 Российская Федерация, МПК C12N1/20, C02F3/34, C12R1:39, C02F3/34. Штамм бактерий *Pseudomonas fluopescens*, разлагающий стирол и этилбензол / М.М. Якимов, И.С. Рогожин Н.А. Загустина, А.М. Безбородов ; заявитель и патенто-обладатель Инновационное производственно-коммерческое предприятие "Инновационные биотехнологии". – № 93031141/13 ; заявл. 02.06.93 ; опубл. 27.09.96.
6. Харвуд, К. Бациллы. Генетика и биотехнология / К. Харвуд. - М.: Изд. «Мир», 1992. - 472 с.).
7. Краткий определитель бактерий Берджи: [под ред. Дж. Хоулт]: [пер. с англ.] / Под ред. чл.-кор. АН СССР Г. А. Заварзина. - Изд. 7-е, - М.: Изд. «Мир», 1980. - 495 с.).
8. Allen, D. A. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery / D. A. Allen, B. Austin and R. R. Colwell // J Gen. Microbiol. - 1983. - № 129. - p. 2043-2062.).
9. Zhuang, W. Q. *Bacillus naphtovorans* sp. nov. from Oil – Contaminated Tropical Marine Sediments and its Role in Naphthalene Biodegradation / W. Q. Zhuang, J. H. Tay, A. M. Maszenan and S. T.-L. Tay // Applied Microbiology and Biotechnology. - 2002. - № 1. - p. 356-370.)
10. Holt J. G., Williams S. T., Holt. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 4. – Lippincott Williams & Wilkins, 1989..
11. Krieg N. R., Manual H. J. C. B. Systematic Bacteriology. – Williams Baltimore, 1984
12. Шестаков, С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий / С.В. Шестаков // Экологическая генетика. – 2007 - Т.5, №2. – С.12-24.

13. Н.Н. Скворцова / Основы молекулярной биологии: Учеб. пособие. Санкт-Петербург 2015. 74 с. [электронный ресурс] - режим доступа: <http://books.ifmo.ru/file/pdf/1750.pdf>
14. Ботина, С.Г. Идентификация промышленных штаммов бактерий методами молекулярно-генетического типирования / С.Г. Ботина // Генетика. – 2006. – Том 42. – №12. – С. 1621-1635.
15. Точилина, А.Г. Индикация и идентификация бактерий рода *Lactobacillus* с использованием полимеразной цепной реакции / Г.А. Точилина // Микробиология, эпидемиология и иммунология. – 2008. – №3. – С. 69-73
16. National Center for Biotechnology Information – [электронный ресурс] : режим доступа <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
17. Паренков, А. Д. Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Часть 2. Методы молекулярной диагностики: учебно–методическое пособие / А.Д. Перенков [и др.]. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. И.Н. Лобачевского, 2015. – 44 с.
18. В.Д. Похilenko, B.B. Перелыгин / Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность, ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, отдел биотехнологий, пос. Оболенск, Московская обл. 2007 г [электронный ресурс] - режим доступа: http://www.cbsafety.ru/rus/saf_32_2f.pdf
19. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике/ Л. В.Лопухов, М.В. Эйдельштейн // КМАХ. — 2000. — Т.2, № 3. — С. 96-106.
20. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Д. Пастернак – Москва : Мир, 2002. – 589 с.
21. Методы биохимических исследований: методические указания к самостоятельной работе [Текст] / сост. О.А Гусейнов. – Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2012. – 44 с.
22. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж // Мир. – 1984. – С. 478.
23. Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Гааль Э., Медьеши Г., Верецкеи Л. //М: Мир. – 1982. – С. 157.
24. Янулайтис А.А. Биотехнология «Ферменты рестрикции и их применение» / А. А. Янулайтис. – Москва, 1989. – Т. 17 – 204с
25. Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз [электронный ресурс] – режим доступа: http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_2.htm
26. Генетика. Энциклопедический словарь. / Н. А. Картель, Е. Н. Макеева, А. М. Мезенко – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992с.
27. Каталог «SibEnzyme» [Электронный ресурс]: каталог продукции. – Новосибирск, 2016 – Режим доступа: http://sibenzyme.com/files/rus_jun_2016.pdf.

28. RFLP Method - Restriction Fragment Length Polymorphism [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/RFLP.html>

29. In silico [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://info-farm.ru/alphabet_index/i/in-silico.html.

30. GenBank [Электронный ресурс] : база данных генетических последовательностей. – USA, [198–]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>.

31. pDRAW32 DNA analysis software [Электронный ресурс] : компьютерная программа. – Режим доступа: <http://www.acaclone.com/>

Приложение - А

Таблица 1 – Рестрикционный анализ ампликонов 500L-1350R

	Arthrobacter globiformis	Agrobacterium Tumefaciens	Achromobacter Xylosoxidans	Micrococcus Luteus
<i>AluI</i>	286 209 207 132 64	244 208 130 126 104 85	333 212 209 104 31	286 209 207 132 64
<i>BstUI</i>	438 260 118 68 14	444 439 14	291 185 154 104 87 39 15 14	438 260 118 68 14
<i>MboI</i>	378 353 114 53	845 52	774 52 51 12	378 353 114 53
<i>HhaI</i>	301 253 157 156 31	298 281 139 115 64	293 276 252 68	301 253 187 157
<i>FatI</i>	256 144 98 81 67 59 54 47 36 29 27	434 149 124 110 46 34	244 236 159 143 61 46	256 144 98 81 67 59 54 47 36 29 27
<i>HaeIII</i>	384 207 146 107 34 20	416 179 171 111 20	356 325 200 8	384 314 146 34 20
<i>HpyCH4IV</i>	289 281 187 59 30 30 22	616 147 66 38 30	651 148 38 30 22	319 281 187 59 30 22
<i>HpaII</i>	378 125 93 82 57 48 42 36 24 13	651 222 24	392 133 130 118 81 24 11	539 93 82 57 48 42 24 13
<i>RsaI</i>	357 252 147 128 14	505 378 14	498 377 14	357 252 147 128 14
<i>MluCI</i>	452 245 116 45 40	453 223 116 45 40 20	446 242 116 45 40	452 245 116 45 40
<i>BfaI</i>	521 175 138 64	802 63 32	513 175 138 63	521 175 138 64
<i>TaqI</i>	450 361 87	448 315 86 48	447 356 86	450 320 87 41
<i>MseI</i>	319 233 134 126 86	316 277 138 80 52 34	311 264 136 68 52 38 20	319 253 134 106 86

Окончание таблицы 1 – Рестрикционный анализ ампликонов 500L-1350R

	Bacillus Pumilus	Bacillus amyloliquefaciens	Bacillus Cereus	Pseudomonas fluorescens
AluI	349 265 207 73	349 265 207 73	556 186 73 58 21	209 207 196 137 131 15
BstUI	445 381 39 15 14	445 294 87 39 15 14	294 209 186 87 50 39 15 14	392 296 87 50 39 15 14 2
MboI	606 187 51 50	606 187 51 50	606 238 50	780 103 12
HhaI	595 299	595 299	346 299 182 63 4	300 279 250 64 2
FatI	437 159 148 106 44	437 159 148 106 44	269 168 148 125 106 44 34	434 205 150 106
HaeIII	457 417 20	457 417 20	457 383 34 20	382 220 171 59 34 20 9
HpyCH4IV	510 148 146 38 29 23	341 169 148 146 38 29 23	656 148 38 29 23	620 148 59 38 30
HpaII	538 211 59 43 23 11 9	538 211 59 43 23 11 9	606 211 43 23 11	549 130 100 81 24 11
RsaI	501 379 14	501 379 14	379 355 146 14	378 357 146 14
MluCI	447 244 116 47 40	447 244 116 47 40	447 244 116 47 40	451 243 116 45 40
BfaI	499 333 62	499 333 62	499 333 62	519 175 138 63
TaqI	450 359 85	450 359 85	450 444	448 361 86
MseI	315 278 134 86 81	278 181 134 134 86 81	271 270 134 86 81 44 8	318 277 134 52 42 38 34

Таблица 2 – Рестрикционный анализ ампликонов 8F-1492R

	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	<i>Achromobacter Xylosoxidans</i>	<i>Micrococcus Luteus strain</i>
<i>AluI</i>	310 286 238 209 208 201 35	243 208 184 159 144 126 125 85 81 49 42	436 328 212 209 155 79 42 31	310 286 237 209 207 164 72
<i>BstUI</i>	382 260 225 166 163 118 105 68	542 443 166 100 100 95	291 245 185 154 144 142 125 104 87 15	543 260 225 166 118 105 68
<i>MboI</i>	732 533 159 56 7	945 232 155 83 24 7	900 183 155 107 77 51 12 7	589 378 353 158 7
<i>HhaI</i>	471 382 254 157 156 42 25	339 334 280 172 115 67 13 9	568 396 276 252	669 406 253 157
<i>FatI</i>	556 187 144 136 98 67 60 54 47 46 36 29 27	526 308 149 124 110 99 50 46 34	397 301 236 159 143 67 61 50 46 32	556 186 144 136 98 67 59 54 47 46 36 29 27
<i>HaeIII</i>	460 228 207 146 108 85 71 55 54 34 22 17	486 191 179 171 123 111 85 66 34	421 356 303 219 100 85 8	460 314 228 146 85 69 55 54 34 22 17
<i>HpyCH4IV</i>	373 349 281 187 136 109 30 22	615 513 147 133 38	651 323 148 133 117 60 38 22	373 319 281 187 135 109 59 22
<i>HpaII</i>	378 176 125 116 93 84 82 77 67 57 53 52 48 37 17 13 12	660 273 222 128 127 22 14	490 392 143 130 127 118 81 11	539 176 163 116 93 82 76 57 53 52 48 17 13
<i>RsaI</i>	455 358 252 155 147 120	824 505 117	498 473 404 117	455 357 252 155 147 119
<i>MluCI</i>	559 527 245 116 40	556 353 222 139 116 40 20	503 349 242 196 116 46 40	557 527 245 116 40
<i>BfaI</i>	620 522 175 170	801 272 207 166	513 403 175 166 112 94 29	620 521 175 169
<i>TaqI</i>	877 362 148 55 45	839 315 189 55 48	892 356 189 55	877 361 147 55 45
<i>MseI</i>	674 425 135 126 86 41	419 385 276 138 101 52 41 34	538 414 264 136 88 52	462 424 253 134 86 85 41

Окончание таблицы 1 – Рестрикционный анализ ампликонов 8F-1492R

	Bacillus Pumilus	Bacillus amyloliquefaciens	Bacillus Cereus	Pseudomonas fluorescens
AluI	429 265 207 186 178 88 85 73	430 265 207 186 177 173 73	599 224 186 177 174 74 5821	403 234 209 207 196 162 72 15
BstUI	445 381 235 166 144 125 15	445 294 235 166 143 126 87 15	294 237 209 184 166 143 126 87 50 15 2	392 389 296 142 125 87 50 15 2
MboI	694 296 187 157 119 51 7	695 296 187 156 119 51 7	814 298 238 156 7	906 260 206 83 24 12 7
HhaI	868 403 240	869 402 240	579 402 346 182 2 2	403 357 279 250 207 2
FatI	763 159 151 148 138 106 46	764 159 150 148 138 106 46	495 269 150 148 140 125 106 46 34	552 336 209 150 106 67 36 32 10
HaeIII	598 457 309 125 22	599 457 309 124 22	565 457 311 124 34 22	682 220 171 161 123 59 39 34 9
HpyCH4IV	510 401 148 146 135 111 38 22	402 341 169 148 146 134 111 38 22	656 402 148 134 113 38 22	651 287 168 148 133 59 38 14
HpaII	538 389 211 129 81 64 59 12 11 9 8	538 390 211 145 128 59 12 11 9 8	606 390 211 147 128 12 11 8	549 490 130 127 110 81 11
RsaI	501 485 406 119	501 486 406 118	488 406 355 146 118	878 357 146 117
MluCI	557 554 244 116 40	558 553 244 116 40	553 364 244 196 116 40	554 545 243 116 40
BfaI	763 333 247 168	764 333 247 167	553 333 249 211 167	519 403 175 111 110 95 71 14
TaqI	906 359 191 55	907 359 190 55	771 549 138 55	893 361 189 55
MseI	592 421 278 134 86	593 278 239 181 134 86	527 376 270 134 86 68 44 8	425 421 277 134 93 52 42 34 20

Приложение - Б

Таблица 3 - концентрация и чистота полученной ДНК

№ Пробы	Концентрация, мг/мл	Чистота препарата A ₂₆₀ :A ₂₈₀
1	60	1,90
2	59	1,85
3	26	1,82
4	35	1,93
5	56	1,82
6	67	1,93
7	36	1,90
8	45	1,89

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
Шишакова Е. И. Шишацкая

«21 » июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Сравнение вариантов метода анализа ПДРФ гена 16S рРНК с использованием
пар праймеров 500L – 1350R и 8F – 1492R

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

Выпускник Маслюкова И.Е. Маслюкова

Красноярск 2018