

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

Подбор рестриктаз для определения вида почвенных бактерий методом  
анализа ПДРФ гена 16S рРНК

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

Выпускник \_\_\_\_\_ У.Ю. Максименко

Красноярск 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	5
1.1 Генетическая система бактерий.....	5
1.2 Традиционные методы идентификации микроорганизмов .....	6
1.3 ДНК.....	8
1.4 Ген 16S рРНК.....	9
1.5 Полимеразная цепная реакция.....	9
1.6 Рестрикция ДНК.....	11
1.7 Электрофорез ДНК .....	14
1.8 Анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов .....	17
1.9 Анализ in silico.....	18
1.10 Методика очистки ДНК ампликонов .....	19
1.11 Характеристика некоторых эндофитных бактерий .....	19
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	20
2.1 Объекты исследования .....	20
2.2 Методика выделения ДНК .....	20
2.3 Проведение полимеразной цепной реакции.....	20
2.4 Методика проведения реакции рестрикции .....	22
2.5 Методика проведения электрофореза .....	22
3 РЕЗУЛЬТАТЫ .....	24
3.1 Выделение ДНК из образцов бактерий <b>Ошибка!</b> <b>Закладка</b> <b>не</b> <b>определена.</b>	
3.2 Получение ампликонов гена 16S рРНК <b>Ошибка!</b> <b>Закладка</b> <b>не</b> <b>определена.</b>	
3.3 Проведение реакции рестрикции ампликонов 500L - 1350R .....	<b>Ошибка!</b>
<b>Закладка не определена.</b>	
3.4 Проведение анализа in silico .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных .....	<b>Ошибка!</b>
<b>Закладка не определена.</b>	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	25

## ВВЕДЕНИЕ

Микрофлора почвы оказывает непосредственное влияние на её плодородие и, как следствие, на урожайность растений. Почвенные микроорганизмы в процессе роста и развития улучшают структуру почвы, накапливают в ней питательные вещества, минерализуют различные органические соединения, превращая их в легко усвояемые растением компоненты питания. Для стимуляции этих процессов применяют различные бактериальные удобрения, обогащающие ризосферу растений полезными микроорганизмами. Микроорганизмы, используемые для производства бактериальных препаратов, способствуют снабжению растений не только элементами минерального питания, но и физиологически активными веществами (фитогормонами, витаминами и др.) [1].

Исследование микроорганизмов невозможно без распознавания их принадлежности к тем или иным биологическим родам и видам. Процесс идентификации является важным этапом проведения биологических исследований.

Ранее работы по классификации бактерий основывались на морфологических и физиологических признаках чистых культур. В последние 30 лет возможности для идентификации бактерий расширились в связи с использованием молекулярно-генетических методов [2].

Применение молекулярно-биологического подхода для идентификации микроорганизмов выявило его принципиальные преимущества по сравнению с традиционным фенотипическим подходом: оно открыло возможность идентифицировать некультивируемые организмы. Появилась возможность с помощью единой методологии осуществлять построение филогенетических систем [3].

Наибольший прогресс в реконструкции филогении микроорганизмов был достигнут благодаря секвенированию различных маркерных генов. В частности, секвенирование гена 16S рРНК, а также анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов маркерных ампликонов позволили пересмотреть систематические взаимоотношения между разными бактериями [4, 5].

Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов маркерных ампликонов является одним из наиболее простых методов идентификации бактерий. Для идентификации некоторых микроорганизмов требуется несколько суток, а то и недель. Используя метод анализа ПДРФ результат можно получить в течении дня.

В представленной работе показана применимость метода анализа ПДРФ для идентификации почвенных бактерий.

В последнее время все более широкое применение находят методы определения микроорганизмов, основанные на сравнении нуклеотидных последовательностей различных генов микроорганизмов и анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ДНК, полученных в результате амплификации отдельных генов бактерий. Наиболее подходящими для идентификации являются гены, кодирующие 16S и 23S рибосомальные РНК, поскольку они присутствуют во всех бактериальных клетках и являются родоспецифичными для большинства микроорганизмов. Использование для идентификации фрагмента ДНК, содержащего как гены 16S и 23S рРНК, позволяет различать близко родственные виды и подвиды микроорганизмов. Ген 16S рРНК используют по трем причинам: достаточная длина (около 900 п.н.), наличие варибельных участков для надежной идентификации до вида и накоплена обширная база данных по последовательностям этого гена. Но бывают случаи, когда варибельность внутри 16S недостаточна для идентификации внутри рода (такое встречается, например, у рода *Bacillus*, *Lactobacillus*), поэтому требуется расширенное исследование, которое может включать также секвенирование 23S и Internal Transcribed Spacer (промежуток между генами 16S и 23S).

**Цель работы:** Используя метод анализа ПДРФ гена 16S рРНК, осуществить подбор рестриктаз для определения вида почвенных бактерий.

Исходя из данной цели, были поставлены следующие **задачи**:

1. Из биомассы почвенных бактерий выделить ДНК и получить ампликоны гена 16S рРНК используя пары праймеров 500L – 1350R.
2. Для полученных ампликонов провести реакции рестрикции используя следующий набор рестриктаз: Sse9 I, Hae III, BstHI I, Rsa I, BspFN I, Msp I, BstMBI.
3. Провести электрофорез продуктов рестрикции, проанализировать полученные электрофореграммы.
4. Провести анализ *in silico* ампликонов 500L – 1350R гена 16S рРНК методом анализа ПДРФ с использованием баз данных GenBank, и построить теоретические электрофореграммы.
5. Сравнить теоретические и практические электрофореграммы и сделать вывод о видовой принадлежности бактерий.
6. Выяснить какие рестриктазы лучше использовать для идентификации определенных видов бактерий.

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

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Генетическая система бактерий

Генетический аппарат, или нуклеоид, является эквивалентом ядра у бактерий. Нуклеоид, состоит из одной замкнутой в кольцо или линейной молекулы ДНК. Структура ДНК представлена антипараллельной двойной правозакрученной спиралью[6].

ДНК прокариот значительно отличается от структурной организации эукариотической ДНК: нуклеоид бактерий не имеет ядерной оболочки, ядрышка и основных белков гистонов (имеются гистоподобные белки - HU, H-NS, IHF, которые участвуют в компактизации ДНК). Геном компактен, количество некодирующих последовательностей ДНК минимально, гены не несут интронов (за исключением архебактерий). Гены – дискретные участки на ДНК, отличаются числом и специфичностью последовательности нуклеотидов, в которых зашифрована информация о структуре и свойствах белков. Каждому белку соответствует свой ген. Для кодирования белков часто используются 2 или 3 рамки считывания одной и той же последовательности ДНК, что повышает кодирующий потенциал генома без увеличения его размера[7].

В клетках бактерий и архей кольцевые или линейные молекулы ДНК прикреплены изнутри к клеточной мембране. Вся ДНК клетки (и хромосомная, и плазмидная) образует геном клетки. Обычно в бактериальной клетке содержится одна хромосома, но бывает и несколько. Длина бактериальной ДНК около 5 млн. п.н., молекула ДНК в развернутом виде может достигать более 1 мм, то есть почти в 1000 раз превышать длину бактериальной клетки. Было установлено, что хромосомы прокариот представляют собой высокоупорядоченную структуру, часть ДНК в этой структуре представлена системой из 20 - 100 независимо суперспирализованных петель. Хромосомы большинства прокариот имеют молекулярную массу в пределах  $1-3 \times 10^9$  Да. Содержание пар оснований А+Т и Г+Ц в молекуле ДНК является постоянным для данного вида организма и служит важным диагностическим признаком [8].

Второй компонент бактериального генома – это плазмиды. Плазмиды – это кольцевые ДНК длиной до нескольких тысяч пар оснований. Число их в каждой клетке колеблется[9]. Плазмиды – автономно реплицирующиеся внехромосомные генетические элементы. Как правило, они представляют собой кольцевые молекулы ДНК. В отличие от хромосом плазмиды являются «необязательным» генетическим материалом, потеря которого не приводит к гибели клетки. Однако многие крупные плазмиды содержат гены, кодирующие важные для клетки функции, которые могут оказаться необходимыми в определенных экологических условиях. Приобретаемые с плазмидами новые признаки в ряде случаев определяют названия плазмид: например, F-плаزمиды

(fertility factor), придающая клеткам донорные свойства, или R-плазмида, определяющая резистентность клеток к антибиотикам [10].

Геномы прокариот являются динамичными структурами даже в пределах одного вида. И исходя из внутривидовой вариабельности геномов сложились представления о базовом и гибком вспомогательном наборе генов. Консервативный базовый набор включает гены так называемого «домашнего хозяйства», ответственные за информационные системы репликации, транскрипции, трансляции, ключевые пути метаболизма и формирования клеточных структур, определяющих родовую принадлежность. В категорию вспомогательных входят операционные гены, контролирующие разные процессы метаболизма и морфофизиологические признаки, обеспечивающие приспособленность к определенной экологической нише. Многие из таких генов локализованы в плазмидах, мобильных элементах, геномных островках, которые не обязательно присутствуют во всех штаммах одного вида [11].

## **1.2 Традиционные методы идентификации микроорганизмов**

Диагностическая микробиология направлена на выявление и идентификацию известных микроорганизмов из окружающей среды. Идентификация бактерий осуществляется с помощью генетических и морфологических методов, до 80-х годов прошлого века преобладало определение фенотипических характеристик [12].

Идентификация микроорганизмов – это определение видовой или родовой принадлежности на основании изучения биохимических, культурально-морфологических, патогенных, серологических и генетических свойств определенного образца.

Культуральные свойства микроорганизмов определяют при помощи посева на жидкие, полужидкие и плотные среды. На жидких средах учитывают степень и характер помутнения среды; величину, форму и консистенцию осадка; наличие или отсутствие плёнки на поверхности; а также смотрят на размер и форму пристеночного кольца. На полужидких средах определяют рост по уколу, на плотных — форму, размер, величину, цвет колоний и густоту роста. На форму, размер, величину, цвет колоний и густоту роста колоний оказывает большое влияние состав питательной среды, и видовая специфичность микроорганизмов.

Морфологию изучают путём микроскопии мазков патологического материала или исследованием посаженных и окрашенных культур. Обычно обращают внимание на размер, форму (кокки, палочки или извитые), расположение (одиночно, цепочками, попарно, гроздьями), наличие спор и капсул, включений и жгутиков. Определяют подвижность (исследование культур в висячей капле или посев на полужидкую среду) [13].

Биохимическую активность и метаболизм микроорганизмов изучают на дифференциально-диагностических средах. Определяют способность бактерий

расщеплять белки, жиры и углеводы; редуцировать органические краски; восстанавливать нитраты в нитриты и нитриты в аммиак; выделять ферменты.

Серологический метод включает исследования сыворотки крови, а также других биологических субстратов для выявления специфических антител и антигенов. Классическая серодиагностика основана на определении антител к выявленному или предполагаемому возбудителю. Положительный результат реакции свидетельствует о наличии в исследуемой сыворотке крови антител к антигенам возбудителя, отрицательный результат указывает на их отсутствие. Обнаружение в исследуемой сыворотке крови антител к возбудителю ряда инфекционных болезней недостаточно для постановки диагноза, поскольку оно может отражать наличие постинфекционного процесса, поэтому исследуют «парные» сыворотки крови, первую, взятую в первые дни болезни, и вторую, взятую с интервалом 7—10 дней. В этом случае оценивают динамику нарастания уровня антител. Однако, нужно учитывать вероятность того, что разные родственные бактерии могут агглютинироваться одной и той же диагностической сывороткой, что может затруднить их идентификацию.

Патогенность исследуемых микроорганизмов изучают заражением лабораторных животных.

На основании полученных данных, используя определители микроорганизмов, устанавливают принадлежность микроорганизма к определённому семейству, роду и виду [14].

Традиционный метод бактериологического анализа включает три основных этапа:

1. Посев исследуемого материала на чашки с дифференциально-диагностическими средами;
2. Снятие отдельных колоний и накопление чистой культуры с первичной дифференциацией на комбинированных питательных средах;
3. Полная идентификация выделенной культуры по комплексу биохимических признаков, антигенной структуре, патогенности, устойчивости к специфическим бактериофагам и антибиотикам.

Время проведения микробиологического анализа обычно составляет от 72 часов до 4-5 суток. Такие сроки не удовлетворяют эпидемиологов. Особенно в виду появления новых, очень опасных заболеваний, таких как, например, лихорадка Эбола[15].

При использовании традиционных методов:

- требуется много времени на идентификацию микроорганизмов;
- затрачиваются значительные материальные ресурсы;
- не определяются некультивируемые бактерии.

Поэтому существует необходимость использовать более современные и быстрые способы диагностики. В качестве эффективного метода идентификации в лабораторной диагностике для определения микроорганизмов все чаще применяется метод ПЦР. Универсальность, высокая чувствительность и относительная простота исполнения сделали метод ПЦР незаменимым для решения таких задач диагностики, как прямое обнаружение и идентификация

микроорганизмов, анализ мутаций, связанных с генетическими заболеваниями у человека и идентификация личности человека [16].

### 1.3 ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) - макромолекула, обеспечивающая хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов.

В большинстве случаев макромолекула ДНК состоит из двух цепей, ориентированных азотистыми основаниями друг к другу. Эта двухцепочечная молекула спирализована. В целом структура молекулы ДНК получила название «двойной спирали». Остов каждой из цепей состоит из чередующихся фосфатов и сахаров [17].

Внутриодной цепи ДНК соседние нуклеотиды соединены фосфодиэфирными связями, которые формируются в результате взаимодействия между 3'-гидроксильной группой молекулы дезоксирибозы одного нуклеотида и 5'-фосфатной группой другого. Асимметричные концы цепи ДНК называются 3' и 5'. Полярность цепи играет важную роль при синтезе ДНК (удлинение цепи возможно только путём присоединения новых нуклеотидов к свободному 3'-концу).

В ДНК встречается четыре вида азотистых оснований. Азотистые основания одной из цепей соединены с азотистыми основаниями другой цепи водородными связями согласно принципу комплементарности. Последовательность нуклеотидов позволяет «кодировать» информацию о различных типах РНК, наиболее важными из которых являются информационные, или матричные (мРНК), рибосомальные (рРНК) и транспортные (тРНК).

Исходя из структуры молекул, основания, входящие в состав нуклеотидов, разделяют на две группы: пурины (аденин и гуанин) образованы соединёнными пяти- и шестичленным гетероциклами; и пиримидины (цитозин и тимин) — шестичленным гетероциклом.

В двойной спирали различают малую (12 Å) и большую (22 Å) бороздки [18]. Белки и факторы транскрипции обычно взаимодействуют с основаниями, расположенными в большой бороздке.

Воспроизведение молекулы ДНК основано на том, что каждая цепь двойной спирали служит матрицей для сборки новых молекул. Открытие ДНК, как и практически все великие открытия, не было результатом работы одинокого гения, а увенчало собой длинную цепь экспериментальных работ [19]. Например, эксперимент Херши—Чейза продемонстрировал, что носителем генетической информации в клетках является именно ДНК, а не белки. Ещё в 1920-е годы американский биохимик Фибус Левин (Phoebus Levene) установил, что основа ДНК, — это пятиатомный сахар дезоксирибоза; фосфатная группа и четыре азотистых основания. В конце 1940-х годов американский биохимик Эрвин Чаргафф выяснил, что во всех ДНК содержится равное количество оснований Т и А, и, аналогично,



равное количество оснований Г и Ц, процент соотношения Т\А и Г\Ц является важнейшей видоспецифичной характеристикой.

#### 1.4 Ген 16S рНК

Идеальным маркером для идентификации микроорганизмов оказался ген, кодирующий 16S рибосомальную рНК [20]. Этот ген есть в геноме всех известных бактерий и архей, но отсутствует у вирусов и ядерных хромосом эукариот. Ген 16S рНК есть в эукариотах в митохондриальной ДНК. Этот ген имеет как консервативные участки так и видоспецифичные [21, 22]. Консервативные участки можно использовать для первого этапа полимеразной цепной реакции — присоединения праймеров к последующей нити ДНК, а видоспецифичные — для определения видов. Степень схожести видоспецифичных участков очень хорошо отражает эволюционную родство различных видов.

Последовательности гена 16S рНК известны для большого количества бактерий и представлены в свободном доступе в генетических базах данных, таких как GenBank. Это позволяет сравнивать полученные последовательности с уже имеющимися, и тем самым идентифицировать микроорганизмы [23].

#### 1.5 Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция – это метод молекулярной биологии, который позволяет добиться значительного увеличения копий определенного фрагмента ДНК в биологическом материале. Метод изобрёл американский биохимик Кэрри Маллис в 1983 году [24].

Метод ПЦР широко используется во всех областях биологии и медицины: молекулярной диагностике (детекции микроорганизмов и вирусов, анализе экспрессии генов, выявлении индивидуальных генетических особенностей), а также в молекулярном клонировании, секвенировании и в других молекулярно-генетических исследованиях [25].

ПЦР - искусственный процесс многократной амплификации специфической последовательности ДНК, осуществляемый *in vitro*.

Копирование ДНК при ПЦР осуществляется специальным ферментом – ДНК-полимеразой, как и в клетках живых организмов. ДНК-полимераза, двигаясь по одиночной цепи ДНК-матрице, синтезирует комплементарную ей последовательность ДНК. Важно, что ДНК-полимераза не может начать синтез цепи ДНК «с нуля», ей необходима короткая «затравочная» цепь – олигонуклеотидный праймер, к которой она может начать присоединять нуклеотиды. Специфичность ПЦР определяется способностью праймеров «распознавать» строго определенный участок ДНК и связываться с ним согласно принципу, молекулярной комплементарности [26].

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее  $0,1^{\circ}\text{C}$ . Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», и последующего хранения амплифицированных молекул при  $4^{\circ}\text{C}$ . Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшетов, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера (затравки, необходимые для инициации синтеза ДНК), комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие [27, 28].
- Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Ионы  $\text{Mg}^{2+}$ , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.
- В пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое, чтобы избежать испарения реакционной смеси. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется.

Вся технология ПЦР состоит из трех этапов:

I этап — подготовка матрицы, которая включает выделение и очистку ДНК или РНК, определение их концентрации, оценку качества матрицы, синтез комплементарной ДНК (кДНК) (в том случае, когда в качестве исходной матрицы выступает РНК), концентрирование (при необходимости повышения чувствительности детекции);

II этап — амплификация или собственно ПЦР;

III этап — разделение и визуализация (детекция) продуктов реакции с помощью аналитического гель-электрофореза или иных инструментальных методов разделения и детекции нуклеиновых кислот.

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

Первый этап предусматривает, нагрев реакционной смеси до температуры, при которой большинство двухцепочечных фрагментов ДНК будут денатурированы и ДНК распадется на отдельные цепи. При этом температура и продолжительность температурной обработки реакционной смеси подбираются так, чтобы основная часть молекул ДНК-полимеразы осталась в неактивированном состоянии (обычно от +93°C до +96°C, 30-120 сек.).

На втором этапе каждого цикла ПЦР реакционная смесь охлаждается до температуры, оптимальной для комплементарного спаривания праймеров со специфическим участком одноцепочечной ДНК-матрицы (обычно от +37°C до +65°C). Праймеры – это короткие (как правило, 18-30 нуклеотидов) химически синтезированные олигонуклеотиды, являющиеся инициаторами синтеза цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание цепи происходит только между ними. Сайты (места) посадки праймеров на ДНК-матрице и определяют размер того участка ДНК, который будет амплифицирован.

Наконец, на третьем этапе происходит синтез комплементарных цепей ДНК, который иницируется праймерами, идет в направлении 5'→3' и катализируется ДНК-полимеразой. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, добавляемые в реакционную смесь. Продолжительность этапа амплификации составляет, в среднем, 20-40сек. и определяется скоростью работы полимеразы и размером того фрагмента ДНК, который нужно синтезировать (обычно от нескольких сотен до 5-6тыс. нуклеотидов) [29].

## 1.6 Рестрикция ДНК

Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы — группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных ДНК в большинстве прокариотических (бактерии и синезеленые водоросли) организмах и выполняющие тем самым "иммунную" функцию [30, 31].

Это ферменты, «узнающие» определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК. Их выделяют преимущественно из прокариотических клеток [32].

В отличие от экзонуклеаз, эндонуклеазы расщепляют нуклеиновые кислоты не с конца молекулы, а в середине. При этом каждая рестриктаза узнаёт определённый участок ДНК длиной от четырёх пар нуклеотидов и больше и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне него.

К 2016 году было выделено более трех с половиной тысяч эндонуклеаз рестрикции. Более тысячи рестриктаз доступны в виде коммерческих

препаратов и повседневно используются в лабораториях для модификации ДНК и решения генно-инженерных задач [32].

Различают 3 класса рестриктаз:

- Рестриктазы первого типа (например, EcoR из *Escherichia coli* K12) узнают определённую последовательность нуклеотидов и разрезают двухцепочную молекулу ДНК неподалёку от этой последовательности в произвольной точке и само место разреза не строго специально [33]. Oller, A.R., Vanden Broek W., Conrad M., Topal M.D. *Biochemistry*, 1991, v. 30, p. 543—549.
- Рестриктазы второго типа (например, EcoRI) узнают определённую последовательность и разрезают двойную спираль ДНК в определённой фиксированной точке внутри этой последовательности. Рестриктазы этого типа узнают палиндромальные последовательности, которые обладают центральной осью и считаются одинаково в обе стороны от оси симметрии.
- Рестриктазы третьего промежуточного типа (например, EcoPI) узнают нужную последовательность и разрезают двухцепочную молекулу ДНК, отступив определённое число нуклеотидных пар от её конца (или в нескольких точках на разном удалении от сайта узнавания). При этом образуются фрагменты ДНК либо с ровными (тупыми) концами, либо с выступающими (липкими) 5'- или 3'-концами. Эти рестриктазы узнают асимметричные сайты [33].

В основном в биотехнологии используют рестриктазы 2-го типа. Ферменты второго типа состоят из двух отдельных белков: рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы. Они нуждаются в ионах магния в качестве кофакторов.

В настоящее время выделено более 500 рестриктаз второго типа, однако среди ферментов, выделенных из различных микроорганизмов, встречаются такие, которые узнают на ДНК одни и те же последовательности. Такие пары или группы называют изошизомерами. Различают истинную изошизомерию, когда ферменты узнают одну и ту же последовательность нуклеотидов и разрывают ДНК в одних и тех же точках, и ложную, когда ферменты, узнавая один и тот же сайт на ДНК, производят разрывы в разных точках в пределах того же сайта.

Большинство рестриктаз второго типа узнают последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупнощепящие. Мелкощепящие рестриктазы узнают тетра-нуклеотид и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупнощепящие, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар. Это связано с тем, что вероятность встречаемости определенной последовательности из четырех нуклеотидов гораздо выше, чем последовательности из шести нуклеотидов. Например, в ДНК бактериофага T7, состоящей из 40000 пар оснований, отсутствует последовательность, узнаваемая рестриктазой R1 из *E. coli*.

К мелкощепящим относятся рестриктазы Hpa II и Alu (из *Arthrobacter luteus*), к крупнощепящим - Eco RI (из *Escherichia coli*) и Hind III. Если предположить, что участки узнавания рестриктаз распределены вдоль цепи ДНК случайно, то мишень для ферментов, узнающих последовательность (сайт) из четырех нуклеотидов, должна встречаться в среднем 1 раз через каждые 256 пар оснований, а для ферментов, узнающих шесть нуклеотидов, - через 4096 пар оснований. Если сайт рестрикции окажется внутри гена, то обработка ДНК-рестриктазой приведет к его инактивации. Вероятность такого события очень велика при обработке мелкощепящими рестриктазами и незначительна при применении крупнощепящих эндонуклеаз. Поэтому с целью получения неповрежденного гена расщепление проводят поочередно несколькими крупнощепящими рестриктазами, либо применяют прием "недорестрикции", т.е. рестрикцию проводят в таких условиях, когда происходит расщепление лишь в одном сайте [34].

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

Рестрикционный анализ ДНК широко используется в молекулярно-биологических исследованиях и прикладных работах и является одним из наиболее важных инструментов при изучении ДНК. При помощи эндонуклеаз рестрикции можно провести изучение ДНК различных вирусов, бактерий, животных, растений [35, 36, 37, 38].

Продукты расщепления ДНК обычно анализируются с помощью гель-электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле, а полученная таким образом картина разделения фрагментов ДНК в виде определенного, отличающегося для разных бактерий, набора полос и является результатом рестрикционного анализа той или иной ДНК [39].

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

При использовании нескольких эндонуклеаз рестрикции для одного образца можно составлять рестрикционные карты. Располагая такой информацией, можно идентифицировать на ДНК биологически важные участки. Поскольку рестрикционная карта отражает расположение определенной последовательности нуклеотидов в данном участке, сравнение

таких карт для двух или более родственных генов позволяет оценить гомологию между ними. Анализируя рестрикционные карты, можно сравнивать определенные участки ДНК разных видов животных без определения их нуклеотидной последовательности. Таким образом, например, было установлено, что хромосомные участки, кодирующие цепи гемоглобина у человека, орангутанга и шимпанзе сохранились в практически неизменном виде в течение последних 5 - 10 млн. лет [39].

Метод рестрикционного картирования позволяет увидеть крупные генетические изменения, такие как делеции или инсерции. При этом происходит уменьшение или увеличение рестрикционных фрагментов, а также исчезновение или возникновение сайтов рестрикции.

## 1.7 Электрофорез ДНК

Электрофорез — это перемещение частиц дисперсной фазы в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля. Впервые был открыт профессорами Московского университета П. И. Страховым и Ф. Ф. Рейссом в 1809 году. Электрофорез является одним из наиболее важных методов для разделения и анализа компонентов веществ в химии. Этот метод находит широчайшее применение для разделения смесей биомолекул на фракции или индивидуальные вещества. Он используется в биохимии, молекулярной биологии, клинической диагностике [40].

В начале 70-х годов было показано, что с помощью гель-электрофореза можно определить длину и чистоту молекул ДНК, а также разделить и выделить нужные фрагменты. Этот метод прост, так как каждый нуклеотид в молекуле нуклеиновой кислоты обладает отрицательным зарядом, который движется к положительному электроду. Чтобы разделить молекулы ДНК, исходя из их размера, электрофорез проводят в гелях. Были разработаны специальные гели, с помощью которых удастся разделить фрагменты ДНК длиной до 500 нуклеотидов, отличающиеся всего лишь на несколько нуклеотидов: полиакриламидные, агарозные. Поскольку поры в полиакриламидном геле для больших молекул ДНК слишком малы, то для разделения молекул ДНК по размеру были разработаны специальные гели на основе агарозы (полисахарида, выделяемого из морских водорослей). Оба эти метода разделения ДНК (в полиакриламидном геле и агарозном геле) широко используются для аналитических и препаративных целей [40].

Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами, например, центрифугированием в градиенте плотности [41].

Агарозный гель-электрофорез используется для разделения молекул ДНК по размеру, определения размера фрагментов ДНК с помощью маркеров. Электрофорез позволяет определения примерное количество ДНК по яркости

свечения полос ДНК в ультрафиолетовом свете благодаря окрашиванию геля бромистым этидием. Просматривая прокрашенный гель в ультрафиолетовом свете, можно заметить даже 1 нг ДНК.

Разделение фрагментов ДНК происходит из-за наличия у них заряда. Фосфатные остатки у нуклеотидов имеют отрицательный заряд, благодаря чему ДНК движется под действием электрического тока от анода к катоду. Напряженность электрического поля при разделении в агарозных гелях составляет 1 – 8 В/см [42,43].

Компоненты электрофореза в агарозном геле:

- **Агароза**

Агароза, природный коллоид, который выделяют из морских водорослей, является линейным полисахаридом (средняя молекулярная масса ~12 000 Да. Агароза очень хрупка, и легко разрушается при манипулировании. Агарозные гели имеют «поры» большого размера и используются преимущественно для разделения больших молекул с молекулярной массой большей, чем 200 кДа.

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

Фрагмент ДНК заданного размера перемещается в геле на различные расстояния в зависимости от концентрации агарозы. При соответствующих концентрациях агарозы и/или буфера возможно разделить сегменты ДНК, содержащие от 20 до 50000 н.п. (нуклеотидных пар).

Обычно используются агарозные гели с концентрацией агарозы от 0.7% до 3%

- **Буфер для электрофореза**

На электрофоретическую подвижность ДНК воздействуют состав и ионная сила буфера для электрофореза. В буфере с высокой ионной силой электропроводность очень эффективна, и образуется значительное количество тепла. В худшем случае, гель расплавляется и ДНК денатурирует.

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

- **ДНК маркеры**

При заданном напряжении, концентрации агарозного геля и буфера, расстояние перемещения зависит от молекулярного веса исходного материала.

Поэтому, маркерная ДНК известного размера должна наноситься на дорожки и с левого, и с правого края геля. Маркер обычно содержит определенный набор известных сегментов ДНК, которые облегчают определение размера исследуемой ДНК, если какое-либо систематическое искривление геля возникнет во время электрофореза.

- **Буфер для нанесения.**

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

Буфер для нанесения используется для трех целей:

- Увеличение плотности образца для обеспечения попадания ДНК в лунку
- 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 [44].

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

1. Размер молекул ДНК. Чем больше молекула ДНК, тем медленнее она перемещается в геле
2. 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.
3. Конформация ДНК. ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, 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.
4. Напряженность электрического поля. При низких напряженностях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Однако 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 [45].

5. Состав оснований и температура. Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях слабо зависит от состава оснований ДНК или температуры геля. В агарозных гелях в области температур от 4 до 30°C изменения относительной электрофоретической подвижности фрагментов ДНК разного размера не наблюдается. Обычно электрофорез в агарозных гелях ведут при комнатной температуре [46].

Наиболее удобный метод визуализации ДНК в агарозных гелях – окрашивание ее флуоресцирующим красителем бромистым этидием. Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. В результате такой 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). Обычно раствор бромистого этидия добавляют и в гель, и в электрофоретический буфер. В его присутствии электрофоретическая подвижность линейной двухцепочечной ДНК снижается примерно на 15%, но зато при этом появляется возможность наблюдать за процессом разделения непосредственно под источником УФ-излучения во время или в конце разделения. Можно также проводить электрофорез в отсутствие бромистого этидия и окрашивать ДНК уже после завершения разделения. В последнем случае гель помещается в электрофорезный буфер или воду, содержащие бромистый этидий, на 30 мин при комнатной температуре. Бромистый этидий является сильным мутагеном. Все манипуляции с гелями и растворами, содержащими краситель, необходимо проводить в перчатках [47].

## **1.8 Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов**

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) — это способ исследования геномной ДНК, путем разрезания ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров, образующихся рестриктов путем гель-электрофореза [48]. При использовании данного исследования получают различные результаты от различных образцов, и при помощи анализа полиморфизма длин фрагментов рестрикции можно идентифицировать некоторые различия в последовательности нуклеотидов ДНК, в случае, когда они располагаются в сайте рестрикции.

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. Следовательно, любая мутация, изменяющая

последовательность нуклеотидов сайта рестрикции, уничтожает этот сайт. Полное расщепление анализируемой геномной ДНК отдельными рестриктазами приводит к образованию определенного набора фрагментов ДНК, число и размеры которых соответствуют расположению сайтов рестрикции. Мутационная изменчивость в сайтах рестрикции может быть легко обнаружена по изменению длины рестрикционных фрагментов ДНК. При наличии мутации в одном из сайтов рестрикции этот сайт остается нерасщепленным после завершения рестрикции, что приводит к слиянию соседних рестрикционных фрагментов ДНК, разделяемых мутантным сайтом, и образованию фрагмента ДНК большего размера. В результате длина рестрикционных фрагментов ДНК, содержащих мутантные сайты, становится полиморфной, что выявляется при сравнении ДНК из разных источников методом ПДРФ [49].

Полиморфизм ДНК в нашем случае — это наличие варибельности в последовательности нуклеотидов в одном и том же гене (выполняющем те же функции) у близкородственных видов. Полиморфизм вызывается несколькими причинами: точечными мутациями в виде единичных нуклеотидных замен, ошибками при репликации ДНК в виде инсерций или делеций протяжённостью от одного до сотен или тысяч нуклеотидов, вставками, транслокациями, транспозициями мобильных генетических элементов и т. п. Все изменения в первичной структуре ДНК ведут к изменениям в длине фрагментов, образующихся под воздействием рестриктаз.

## **1.9 Анализ *in silico***

*In silico* – термин, обозначающий компьютерное моделирование эксперимента (чаще биологического). Термин был создан по аналогии с фразами *in vivo* (в живом организме) и *in vitro* (в пробирке), которые часто используются в биологии.

Таким методом анализируют нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности, используя специальное программное обеспечение, при помощи которого производят: выравнивание последовательностей, поиск гомологичных последовательностей ДНК, РНК и белков, построение филогенетических карт. 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.

В настоящее время имеется огромное количество генетических данных, находящихся в открытом доступе на специализированных порталах. Математическая, аналитическая и программная обработка данных последовательностей имеет явное преимущество перед экспериментальными исследованиями в области трудоемкости, стоимости и времени [50].

Применение биоинформационного подхода позволяет планировать и моделировать эксперименты для того что бы снизить вероятность ошибки в

ходе практического эксперимента, а также снизить количество потребляемых ресурсов.

### **1.10 Методика очистки ДНК ампликонов**

Очистку ампликонов проводил с помощью набора фирмы Isogene Laboratory Diatom™ DNA Clean-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 проводится в объеме, а выделение ДНК - в микропробирке типа эппендорф. Выделенная ДНК используется в молекулярно-биологических реакциях без дополнительной очистки. Набор предназначен для элюции 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.

Далее можно сразу приступить к работе с очищенной ДНК или хранить ее в течении длительного времени при -20°C.

### **1.11 Характеристика некоторых эндофитных бактерий**

Эндофитные бактерии являются существенной детерминацией перекрестной толерантности к биотическим и абиотическим стрессам в растениях.

Интерес к эндофитным бактериям увеличился, поскольку они колонизируют внутренние ткани их растений-хозяев, улучшают устойчивость растений к различным абиотическим стрессовым факторам и могут защищать растения от различных патогенных микробов.

Штамм *B. subtilis* стимулирует рост растений, улучшает симбиотические характеристики растения – хозяина с ризобией и повышает урожайность в соленой почве, по сравнению с необработанными растениями в полевых условиях. Кроме того, *B. subtilis* способен снижать уровень инфекции корневой гнили в нуте, вызванной *F. solani*.

Эндофильный штамм *B. subtilis* обеспечивает высокие потенциалы в качестве стимулятора роста растений и биологического контрольного агента корневой гнили нута в условиях засоленных почв. Это может обеспечить перспективные практические подходы к повышению продуктивности бобовых под воздействием солевого стресса.

Так же к эндофитным бактериям относятся *A. xylosoxidans*, *B. thuringiensis* и *B. cereus*[51].

## **2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Объекты исследования**

Образцы были представлены Ольгой Кондратенко, магистрантом кафедры биотехнологии из группы индийского исследователя Саеда Бакера.

### **2.2 Методика выделения ДНК**

Выделение бактериальной геномной ДНК осуществляли при помощи набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit и входящей в состав набора инструкции. Методика выделения основана на эффективном выходе геномной ДНК посредством специального лизисного буфера GA. После этого быстрое отделение геномной ДНК от протеинов, полисахаридов и липидов достигалось фазоразделительным шагом при добавлении буфера DV. Высокоочищенная геномная ДНК находилась в нижней фазе. Нижнюю фазу с растворённой в ней ДНК наносили на фильтр и центрифугировали. На фильтре оседают оставшиеся белки, липиды и полисахариды, а также клеточные стенки бактерий. Следующим шагом раствор ДНК наносили на колонку, где ДНК связывается с ней благодаря буферу BV (ДНК связывающий буфер). Центрифугировали один раз после добавления промывочного буфера W1 и два раза после добавления буфера W2. Центрифугировали 2 минуты при 12000 оборотах. Это делали для того, чтобы очистить ДНК от нежелательных молекул и солей, которые могли пройти через фильтр. Очищенную бактериальную ДНК элюировали с колонки элюентом (2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5.) буфером [52].

### **2.3 Проведение полимеразной цепной реакции**

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера (затравки, необходимые для инициации синтеза ДНК), комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК.
- Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

- Ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — рН, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

На одну пробу объемом 50мкл требуется:

- 27 мкл дист. воды
- 5 мкл 10х буфера
- 5 мкл + 5 мкл праймеров с концентрациями по 1μM (500 L - 1350 R)
- 3 мкл  $MgCl_2$  с концентрацией 2.5mM

Все вещества смешивали в 1 пробирке объемом 1,5 мл из расчета на 24 проб, затем в каждую было добавлено по 47 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемой ДНК. После горячего старта в каждую из пробирок добавили по 1 мкл ДНК Tag - полимеразы.

Ход реакции:

Проведение ПЦР – процесс сложный и занимает приблизительно 25-30 циклов. Каждый из циклов состоит из трех стадий. Это нужно для получения достаточного количества копий искомого характеристического фрагмента ДНК.

1. Горячий старт – одна из первых стадий. ДНК нагревают до 96°C в течение трех минут. Затем температуру понижают до 72°C, чтобы добавить фермент. Далее фермент нет необходимости добавлять, поскольку ДНК-полимеразу изготавливают из термофильных бактерий. Поэтому она термостабильная и способна выдерживать высокие температуры.
2. Денатурация. На этой стадии происходит расплетение нитей ДНК под действием на нее высокой температуры- 95 °C. Длительность – две минуты.
3. Отжиг. Здесь происходит присоединение праймеров с соответствующими последовательностям на противоположных цепях ДНК. Температура составляет 57°C (подобрана экспериментальным путем), длительность 20 секунд.
4. Синтез (элонгация). Синтез производится при температуре приблизительно 72°C. Температура зависит от размера куска ДНК и от используемой полимеразы. После синтеза идет повтор циклов.
5. Финальная элонгация. Используется для окончательного достраивания всех одноцепочечных фрагментов. На все это уходит 7-10 минут.
6. Хранение возможно при температуре 4°C в течение 18 часов.

Используемая программа при проведении ПЦР:

1. 95°C – 2 мин;
2. 80°C – 2 мин;
3. 95°C – 0:10 сек;
4. 64°C – 0:15 сек;
5. 72°C - 1:00 мин;
6. GO TO 3 35 times;
7. 72°C – 4:00;

8. 4°C – 18:00:00ч;

9. END.

Для визуализации результатов амплификации использовали электрофорез. После окончания электрофореза гелемещали в транслюминатор геле-документирующей системы.

Проведенный электрофорез ампликонов ДНК показал что реакция ПЦР прошла успешно и мы смогли выделить участки ДНК гена 16S рРНК длиной 900 пар оснований.

## 2.4 Методика проведения реакции рестрикции

Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 2 ч. в приборе Thermomixercomfort производство фирмы Eppendorf. Реакция проходила при 37 °С (для рестриктаз Sse9 I, Hae III, BstHI I, Rsa I, BspFI I, Msp I); 50 °С (BstHI I) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 ед. акт. рестриктазы.

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

- 5 мкл 10х буфера
- 10 мкл разб. BSA
- 25 мкл H<sub>2</sub>O
- 10 мкл ДНК
- 5 мкл фермента (активность фермента 10 000 е.а/мл)

Все вещества смешали в 1 пробирке объемом 2 мл, из расчета на 24 пробы, затем в каждую пробирку добавили по 35 мкл данной смеси и по 15 мкл исследуемой ДНК. Смесь готовили на ледяной подставке.

Для визуализации результатов рестрикции использовали электрофорез.

Все использованные нами рестриктазы имеют тетра-нуклеотидный сайт узнавания, что позволило получить от 3 до 7 фрагментов ДНК в результате расщепления продуктов амплификации, имеющих длины порядка 900 пар оснований.

## 2.5 Методика проведения электрофореза

Реактивы:

- 0,85 г агарозы для получения 1,7% геля
- 50 мл электрофорезного буфера TBE
- ДНК Маркеры
- Буфер для нанесения пробы
- Бромистый этидий
- Образцы ДНК
- Вода

Агарозу смешивали с буфером для электрофореза, полученную смесь нагревали и кипятили 1 минуту в СВЧ-печи пока не образовалась равномерная

суспензия. Полученную суспензию охлаждали до 60°C. В форму для агарозы заранее была установлена гребенка куда после остывания была залита охлажденная суспензия. Форму с гелем оставляли на 30 минут для застывания. Пока гель застывал необходимые пробы ДНК, и праймеры смешивали в отдельном планшете. После того как гель затвердел, гребенка аккуратно извлекалась и подложку с гелем перемещали в электрофорезную кювету. Необходимо следить за тем, чтобы сторона геля с лунками куда будут вноситься пробы ДНК была со стороны анода. В лунки помещались пробы ДНК и по бокам ДНК Маркеры. После добавления проб гель заливали электрофорезным буфером, так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1-2 мм. Электрофорезную камеру закрывали и присоединяли электроды к источнику напряжения. Напряженность при проведении электрофореза составила 80V в течении 2-х часов. По окончанию разделения подложку с гелем вынимали и помещали в красящий раствор бромистого этидия (1 мкг/мл). После 30 мин. прокрашивания подложку вместе с гелем промывали в дистиллированной воде в течение 2 минут. Далее гель помещали в трансиллюминатор гель-документирующей системы и рассмотрела гель в проходящем ультрафиолетовом свете.

Необходимое оборудование для проведения электрофореза:

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

### **3 РЕЗУЛЬТАТЫ**

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



## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ


1. Бактериальные удобрения на основе клубеньковых бактерий, нитрагин и ризоторфин - [Электронный ресурс]: Режим доступа: [http://www.biotechnolog.ru/prombt/prombt9\\_4.htm](http://www.biotechnolog.ru/prombt/prombt9_4.htm)
2. Горохова, С.С. Основы микробиологии, производственной санитарии и гигиены : учеб. пособие / С. С. Горохова, Н. А. Прокопенко, Н.В. Косолапова. – 4-е изд. – Москва: Академия, 2013. – 64с.
3. 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.
4. Frajman, V. Phylogenetic relationships of *Atocion* and *Viscaria* (Sileneae, Caryophyllaceae) inferred from chloroplast, nuclear ribosomal, and low-copy gene DNA sequences / V. Frajman, N. Heidari, V. Oxelman // *Taxon*. – 2009. – Vol. 58. – № 3. – P. 811-824
5. Rautenberg, A. Geographic and phylogenetic patterns in *Silene* section *Melandrium* (Caryophyllaceae) as inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences / A. Rautenberg, L. Hathaway, V. Oxelman, H.C. Prentice // *Molecular Phylogenetics and Evolution* – 2010. – Vol.57. – № 3. – P. 978
6. Лысак, В.В. Л88 Микробиология: учеб. пособие / В. В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. – 000 с.: ил. ISBN 985-485-709-3.
7. Гусев, М.В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. — Москва: Изд-во МГУ, 2004. — 448с.
8. Прунтова, О.В. Курс лекций по общей микробиологии и основам вирусологии. В 2 ч. Ч. 1 / О. В. Прунтова, О. Н. Сахно, М. А. Мазиров; Владим. гос. ун-т. - Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та, 2006. - 192с.
9. Попова, Н.А. Введение в биологию. учеб. пособие / Н. А. Попова. – Новосибирск: Новосиб. гос. университет. – 2012. – 271 с.
10. Квитко, К.В., Захаров И.А. Генетика микроорганизмов: уч. пособие / К.В. Квитко, И.А. Захаров под ред. А.В. Пиневича. – 2-е изд. – Санкт-Петербург: Изд. дом СПб. ун-та, 2012. – 268с.
11. Шестаков, С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий / С.В. Шестаков // *Экол. генетика*. 2007. Т. 5, № 2. – С. 12–24.
12. Онищенко, Г. Г. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей: методические указания / Г. Г. Онищенко. - Москва: Минздрав России, 2003. –37 с.
13. Воробьев, А. А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник / А. А. Воробьев. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2004. - 690 с.
14. Асонов, Н. Р. Микробиология: учебник / Н. Р. Асонов. - Москва: Колос-Пресс, 2002. - 352 с.

15. Покровский, В. И. Инфекционные болезни и эпидемиология: учебник / В. И. Покровский, С. Г. Пак. - 2-е изд. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 697с.
16. Покровская, М. С. Лабораторная диагностика ЗППП и полимеразная цепная реакция: лекция [Электронный ресурс] / к.б.н. М. С. Покровская, Г. Б. Смирнов // ЗАО ЛагиС. - 2002. Режим доступа: [http://lages-lab.ru/article\\_11.htm](http://lages-lab.ru/article_11.htm)
17. Ghosh, A. A. glossary of DNA structures from A to Z / A. Ghosh, M. Bansal // Acta Crystallographica Section D. - 2003. - №59. - P. 620-626.
18. Pabo, C. Protein - DNA recognition / C. Pabo, R. Sauer // Annual Review Biochemistry. - 1984. - № 53. - P. 293-321.
19. Persson, F. Fluorescence Microscopy of Nanochannel-Confined DNA / F. Persson, F. Westerlund // Single Molecule Analysis. - 2011. - № 783. - P. 159-179.
20. Жимулев, И. Ф. Общая и молекулярная генетика / И. Ф. Жимулев. - Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2003. - 480 с.
21. Патрушев, Л. И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. - Москва : Наука, 2004. - 530 с.
22. Колтовая, Н. А. Практикум по молекулярной биологии / Н. А. Колтовая. - Москва : Наука, 2010. - 31 с.
23. National Center for Biotechnology Information – [Электронный ресурс] : Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
24. Паренков, А.Д. Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Часть 2. Методы молекулярной диагностики: учебно-методическое пособие / А.Д. Паренков [и др.]. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. И.Н. Лобачевского, 2015. – 44с.
25. Александров, А.А. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики и оценки эффективности химиотерапии туберкулеза: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Александров Андрей Александрович. – Москва. – 94с.
26. Лопухов, Л. В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике / Л. В. Лопухов, М. В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т. 2. – № 3. – С. 96-106.
27. Патрушев, Л.И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. — Москва: Наука, 2005. – в 2 т. – 276с.
28. Оберемок, В.В. Методические рекомендации к применению ПЦР-метода / В.В. Оберемок: методические указания. – Симферополь, 2008. – 35с.
29. Гринев, В.В. Введение в технику полимеразной цепной реакции: метод. пособие к лабораторным занятиям по специальному практикуму для студентов биол. фак. / В.В. Гринев. – Минск: БГУ, 2008. – 48с.
30. Pingoud, A. et al. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism / A. Pingoud et al. // Cellular and molecular life sciences. – 2005. – Т. 62, №. 6. – P. 685-707.

31. Чмуж, Е. В. Новая эндонуклеаза рестрикции *BisI* из *Bacillus subtilis* ТЗО узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G (m5C)> 1'NGC-3' / Е. В. Чмуж [и др.]. Биотехнология. – 2005. №. 3. – С. 22–26.
32. Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз [электронный ресурс] – Режим доступа: [http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3\\_2.htm](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_2.htm)
33. Oller, A.R., Vanden Broek W., Conrad M., Topal M.D. *Biochemistry*, 1991, V. 30, P. 543-549.
34. Slaymaker, I. M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D. A., Yan, W. X., & Zhang, F. (2016). «Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity». *Science* 351 (6268): P. 84-88.
35. Чернухин В. А. Сравнительный рестрикционный анализ хромосомной ДНК крысы *in vitro* *in silico* / В. А. Чернухин, М.А. Абдурашитов, В.Н. Томилов, Д.А. Гончар, С.Х. Дегтярев // Вестник биотехнологии. – 2006. – Т. 2, №. 3. – С. 39.
36. Белова, Е. Г. Герпесвирусы 6, 7, 8-го типов / Е. Г. Белова, Т. К. Кускова // Лечащий врач. – 2006. – Т. 2, С. 76–79.
37. Кравец, А. П. Изменения профиля метилирования ДНК растений пшеницы при хроническом  $\gamma$  облучении семян / А. П. Кравец, Т. А. Мюссе, А. В. Литвинчук, Ш. Остермиллер, Г. С. Венгжен, Д. М. Гродзинский // Цитология и генетика. 2010. № 5. – С. 18–22.
38. Зернов, Ю. П. Использование рестрикционного анализа амплифицированного гена 16S РНК для идентификации микроорганизмов на примере бактериальных продуцентов термолabileй щелочной фосфатазы / Ю. П. Зернов, М. Л. Абдурашитов, С. Х. Дегтярев // Биотехнология. – 2005. №. 6. – С. 3–11.
39. Абдурашитов, М. А. Метод рестрикционного анализа геномов млекопитающих *in silico* / М.А. Абдурашитов, В.Н. Томилов, В.А. Чернухин, Д.А. Гончар, С.Х. Дегтярев // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинников : Москва, 2006. – Т.2, № 3 – С. 29–39.
40. Pingoud, A. et al. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism / A. Pingoud et al. // *Cellular and molecular life sciences*. – 2005. – Т. 62. – №. 6. – С. 685-707.
41. Гусейнов, О.А. Методы биохимических исследований: учеб.-метод. пособие к лаб. занятиям / Сиб. федерал. ун-т; сост. О. А. Гусейнов. – Красноярск: СФУ, 2012. – 46с.
42. Лагодич, А.В. Методы анализа нуклеиновых кислот: учеб.-метод. пособие для студентов биол. фак. / А. В. Лагодич, О.В. Лагодич. – Минск: БГУ, 2013. – 47с
43. Васильева, Л.Г. Выделение плазмидной ДНК и ее анализ методом горизонтального электрофореза в агарозном геле: методическое руководство для школы молодых ученых / Л. Г. Васильева. – Москва: Пушкино, 2016. – 6 с.

- 44.Сомма, М. Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов. Сессия 5. Электрофорез в агарозном геле / М. Сомма, М. Кверчи / Всемирная организация здравоохранения. Европейское бюро. – 13с.
- 45.Lucotte, G. Introduction to Molecular Cloning Techniques / G. Lucotte; F. Vaneyx // Wiley-Blackwell. – 1993. – P.41.
- 46.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. – 86с.
- 47.Шлык-Кернер, О.В. Основы генетической инженерии: лабораторный практикум / О.В. Шлык-Кернер. – Ижевск: Удмуртский университет, 2012. – 56с.
- 48.Rasmussen, H.B. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis – valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting /H. B. Rasmussen / InTech, 2012.
- 49.RFLP Method - Restriction Fragment Length Polymorphism [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/RFLP.html>
- 50.Пономарева, Н. С. Применение расстояний редактирования при биоинформационном анализе геномов для задач оценки состояния репродуктивной системы / Н. С. Пономарева., Г. Н. Реброва, Е. А. Колина // Фундаментальные исследования. – 2015. №. 7. – С. 774–777.
- 51.Egamberdieva D1,2, Wirth SJ1, Shurigin VV2, Hashem A3,4, Abd Allah EF5. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29033922>
- 52.Выделение ДНК [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.bioprotech.com.tw/databank/DataSheet/DNARNAPuri/axyprep%20bacterial%20genogen%20DNA%20miniprep%20kit.pdf>

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

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
 Е. И. Шишацкая

« 19 » июня 2018 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Подбор рестриктаз для определения вида почвенных бактерий методом  
анализа ПДРФ гена 16S рРНК

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

Выпускник  \_\_\_\_\_ У.Ю. Максименко

Красноярск 2018