

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ
AKKERMANCIA MACINIPHILA МЕТОДОМ ПЦР

Выполнил: Мингалиева Элиза Фанисовна
направление подготовки

06.04.01 Биология

Направленность (профиль)
образовательной программы
Фундаментальная и прикладная
микробиологии

Руководитель: Гимранова Ирина
Анатольевна, к.м.н., заведующая кафедры
Фундаментальной и прикладной
микробиологии

Выпускная квалификационная работа
допущена к защите

«17 » 06 2025 г.

Выпускная квалификационная работа
защищена с оценкой « отлично »

«24 » 06 2025 г.

Уфа – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	3
Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Роль <i>Akkermansia muciniphila</i> в микробиоте кишечника.....	6
1.2 Функциональная значимость <i>Akkermansia muciniphila</i> в метаболизме и иммунитете.....	8
1.3 Влияние изменений уровня бактерии <i>Akkermansia muciniphila</i> на развитие различных заболеваний.....	10
1.4 Основные методы детекции.....	12
1.5 Молекулярные методы.....	20
1.6 Выбор праймеров для амплификации ДНК <i>Akkermansia muciniphila</i>	35
Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
2.1 Образцы исследования.....	44
2.2 Подготовка положительного (ПКО) и отрицательного (ОКО) контрольного образца для ПЦР-исследования.....	48
2.3 Выделение ДНК из биологического материала коммерческим набором MagPure Bacterial DNA Kit.....	51
2.4 Проектирование праймеров.....	53
2.6 Экстракция ДНК из биологического материала.....	60
2.7 Анализ продуктов ПЦР.....	63
2.8 Статистическая обработка данных.....	66
Глава III РЕЗУЛЬТАТЫ.....	67

3.1 Результаты Гель-электрофореза.....	67
3.2 Сравнительный анализ полученных данных.....	68
Заключение.....	70
ВЫВОДЫ.....	71
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	72

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КЖК - короткоцепочечные жирные кислоты

ПЦР - полимеразная цепная реакция

qPCR - количественная ПЦР

16S рРНК - рибосомальная РНК размером около 16S

Treg - регуляторные Т-клетки

TNF- α - фактор некроза опухоли альфа

IL-6 - интерлейкин-6

ВЗК - воспалительное заболевание кишечника

NGS - секвенирование нового поколения

Ct - пороговый цикл

ctDNA - циркулирующая опухолевая ДНК

dNTPs - дезоксирибонуклеотидтрифосфаты

Tm - температура плавления

ПКО – положительный контрольный образец

ОКО – отрицательный контрольный образец

NCBI - национальный центр биотехнологической информации

ddH₂O - деионизированная вода

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Кишечная микробиота является ключевым компонентом здоровья человека, выполняя важные функции в пищеварении, иммунной системе, метаболическом регулировании и профилактике различных заболеваний. Нарушение баланса микрофлоры, известное как дисбактериоз или дисбиоз, связано с развитием множества патологий, таких как ожирение, сахарный диабет второго типа, воспалительные процессы в кишечнике и сердечно-сосудистые болезни.

Особое внимание уделяется изучению роли бактерии *Akkermansia muciniphila*, способствующей восстановлению слизистых оболочек кишечника, нормализации углеводного и жирового обменов, снижению риска диабета и атеросклероза. Бактерия демонстрирует противовоспалительные эффекты и положительно влияет на баланс микробиоты.

Перспективы применения *Akkermansia muciniphila* включают разработку пробиотиков и диетических добавок для профилактики и лечения заболеваний, вызванных нарушением микробиоты. Для успешного

использования необходимо обладать быстрым и надежным способом идентификации бактерии в организме.

Традиционные методы (культтивирование, микроскопия) недостаточно эффективны, тогда как молекулярный метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет оперативно и точно определять присутствие *Akkermansia muciniphila* в образцах. Именно поэтому создание такой тест-системы крайне востребовано для научных исследований и медицинского применения.

Практическая значимость

Практическая ценность данной работы заключается в создании инструмента, который может быть использован в диагностических лабораториях для мониторинга состояния микробиоты у пациентов с различными заболеваниями. Это особенно актуально для:

- исследований в области гастроэнтерологии;
- изучения влияния диеты и лекарственных препаратов на состав микробиоты;
- разработки персонализированных диетологических рекомендаций.

Цель исследования

Разработать и апробировать олигонуклеотидные праймеры, как основу тест системы для идентификации *Akkermansia muciniphila* методом полимеразной цепной реакции из различного материала.

Задачи исследования

1. Провести множественное выравнивание известных последовательностей ДНК *Akkermansia muciniphila*, зарегистрированных в международных базах данных генов EMBL/GenBank/DDBJ, с целью поиска наиболее консервативных участков и подбора соответствующих олигонуклеотидных праймеров

2. Выделить ДНК из биологического материала.

3. Провести испытания сконструированной тест-системы на основе разработанных праймеров на положительных и отрицательных контрольных образцах для оценки их чувствительности, и специфичности.

4. Провести ПЦР с различным биологическим материалом с подобранными праймерами.

5. Анализ полученных данных и формулирование выводов.

Научная новизна.

Работа отличается новизной, так как существующие методы детекции *Akkermansia muciniphila* часто имеют ограниченные возможности в плане чувствительности и специфичности. Предлагаемый подход предполагает использование современных технологий молекулярной биологии, что повысит точность и скорость получения результатов.

Практическая значимость

Практическая ценность данной работы заключается в создании инструмента, который может быть использован в диагностических лабораториях для мониторинга состояния микробиоты у пациентов с различными заболеваниями. Это особенно актуально для:

- исследований в области гастроэнтерологии;
- изучения влияния диеты и лекарственных препаратов на состав микробиоты;
- разработки персонализированных диетологических рекомендаций.

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Роль *Akkermansia muciniphila* в микробиоте кишечника

История открытия и описание бактерии *Akkermansia muciniphila*

Бактерию *Akkermansia muciniphila* впервые открыли и описали голландские учёные Марвин Дерик (Marvin Derrien) и Виллем де Вос (Willem de Vos) в 2004 году. Название бактерии происходит от фамилии одного из первооткрывателей, Антона Акерманса (Anton Akkermans), а также от латинского слова *muciniphila*, что переводится как "любящая слизь". Такое название отражает её уникальную способность питаться муцином — главным компонентом слизистого слоя кишечника.

Описание бактерии

Морфология: *Akkermansia muciniphila* имеет характерную овальную форму и покрыта многочисленными ворсинками (фимбриями), которые обеспечивают ей прочное прикрепление к поверхности слизистой оболочки кишечника.

Грам-статус: Грамотрицательная бактерия, что означает наличие внешней мембраны, усложняющей её идентификацию и лечение антибиотиками.

Аэробные/анаэробные характеристики: *Akkermansia muciniphila* анаэробна, то есть предпочитает среду с низким содержанием кислорода, что идеально соответствует условиям внутри толстого кишечника.

Спорообразование: Не формирует споры, что делает её более уязвимой к внешним факторам, таким как антибиотики или изменение рН среды.

Место обитания: *Akkermansia muciniphila* преимущественно обитает в просвете кишечника и тесно связана со слизистым слоем, где находит оптимальное питание и условия для роста. Её уникальная способность расщеплять муцин позволяет поддерживать целостность слизистой оболочки, играя важную роль в защите организма от патогенов.

Исторический контекст открытия

Открытие *Akkermansia muciniphila* стало важным событием в изучении микробиоты кишечника. До этого момента основное внимание уделялось бактериям, которые легко культивировались в лабораторных условиях, однако *Akkermansia muciniphila* оказалась одной из тех микроорганизмов, которые трудно вырастить традиционным способом. Именно поэтому её открытие потребовало применения новейших молекулярных методов, таких как секвенирование генов рибосомальной РНК (16S рРНК).

После первоначального описания бактерия привлекла внимание учёных всего мира благодаря своему уникальному положению в экосистеме кишечника и связи с важными аспектами здоровья человека. Дальнейшие исследования подтвердили её значимость в регуляции метаболизма, иммунитета и защиты от воспалительных заболеваний.

Современное значение

Сегодня *Akkermansia muciniphila* считается одной из ключевых бактерий, участвующих в поддержании здорового баланса микробиоты. Её присутствие в кишечнике положительно коррелирует с нормальным весом, устойчивостью к диабету и низкими уровнями воспаления. Напротив, снижение численности *Akkermansia muciniphila* связано с развитием ожирения, метаболическим синдромом и хроническими воспалениями.

Исследование роли *Akkermansia muciniphila* продолжается, и сейчас эта бактерия рассматривается как потенциальный кандидат для использования в пробиотиках и лечебных терапиях, направленных на восстановление здоровой микрофлоры кишечника.

1.2 Функциональная значимость *Akkermansia muciniphila* в метаболизме и иммунитете.

1. Метаболизм

Akkermansia muciniphila играет важную роль в регулировании энергетического обмена и гомеостаза глюкозы в организме. Она увеличивает эффективность абсорбции питательных веществ в кишечнике, одновременно снижая проницаемость кишечного барьера, что предотвращает попадание токсичных веществ и бактерий в кровь.

- Участие в производстве короткоцепочечных жирных кислот (КЖК)

Akkermansia muciniphila активно участвует в образовании бутират — одного из основных источников энергии для клеток кишечного эпителия. Бутират улучшает регенерацию слизистой оболочки кишечника, поддерживает её барьерные функции и уменьшает воспаление. Благодаря этому снижается риск развития воспалительных заболеваний кишечника и улучшается общая функциональность желудочно-кишечного тракта.

- Поддержание гликемического контроля

Akkermansia muciniphila помогает регулировать уровень глюкозы в крови, улучшая чувствительность тканей к инсулину. Это делает её важным игроком в профилактике и лечении метаболических нарушений, таких как диабет второго типа и ожирение.

2. Влияние на иммунную систему

- Поддержка защитного слоя слизистой. *Akkermansia muciniphila* укрепляет слизистую оболочку кишечника, снижая вероятность проникновения вредных веществ и микроорганизмов в кровь. Благодаря этому уменьшается риск возникновения инфекций и воспалений желудочно-кишечного тракта.
- Регулирование иммунитета. Эта бактерия стимулирует выработку клеток, регулирующих иммунитет, что позволяет предотвратить нежелательную реакцию организма на собственные ткани.
- Борьба с антибиотикорезистентностью. *Akkermansia muciniphila* успешно подавляет рост патогенных бактерий, конкурируя с ними за пищевые вещества и места прикрепления на слизистых оболочках организма.
- Предотвращение онкологических процессов. Исследования показывают, что эта бактерия способна уменьшать факторы риска развития опухолей толстого кишечника, укрепляя барьерную функцию слизистой и защищая организм от хронического воспаления.
- Способность противостоять окислительному повреждению. Микроорганизм повышает способность клеток противостоять

повреждению свободными радикалами, способствуя защите и восстановлению тканей слизистой оболочки кишечника.

1.3 Влияние изменений уровня бактерии *Akkermansia muciniphila* на развитие различных заболеваний

1. Метаболический синдром и ожирение

Бактерия *Akkermansia muciniphila* играет важную роль в организме человека, а именно в микробиоте кишечника. Низкий уровень данной бактерии может повлечь за собой риск появления нарушений обмена веществ и лишнего веса. Снижение этой бактерии влияет на защитные свойства слизистой оболочки. Вследствии чего могут развиваться хронические воспалительные заболевания.

Обратная картина наблюдается при повышении уровня *Akkermansia muciniphila* в микробиоте человека. Наблюдается снижение веса и улучшение метаболических показателей.

2. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК)

У пациентов с воспалительными заболеваниями наблюдается уменьшение численности *Akkermansia muciniphila* в кишечнике. Есть вероятность того что недостаток данной бактерии ослабляет защитные свойства слизистой оболочки и делает ее мишенью для патогенных микроорганизмов.

Повышение уровня *Akkermansia muciniphila* способствует восстановлению слизистой оболочки и снизить выраженность симптомов воспалительных заболеваний кишечника.

3. Иммунитет и профилактика аутоиммунных заболеваний

Недостаточный уровень *Akkermansia muciniphila* увеличивает риск возникновения аутоиммунных состояний. бактерия способствует правильной работе иммунной системы организма, предотвращая возникновение хронических воспалений.

4. Противораковая защита

Так как уменьшение уровня бактерии *Akkermansia muciniphila* способствует неблагоприятным изменениям кишечной микробиоты, есть вероятность увеличения риска развития опухолей толстого кишечника и прямой кишки.

5. Нервная система и психическое здоровье

Научные исследования выявили связь с изменениями состава кишечной микрофлоры и нервной системы. Полагается, что уменьшение количества бактерии *Akkermansia muciniphila* способно повлиять на синтез важных сигнальных веществ и механизмы регуляции стрессоустойчивости.

6. Возрастные изменения и общее состояние здоровья

С возрастом у человека наблюдается ряд изменений в организме, в том числе и уменьшение уровня *Akkermansia muciniphila*. Это влияет на общее самочувствие и стимулирует процесс старения организма.

1.4 Основные методы детекции

1. Бактериологические методы

Культивирование. Это классический метод, основанный на выделении бактерий из образца и их последующем росте на питательных средах. *Akkermansia muciniphila* является строгим анаэробом, поэтому для её

культивирования требуется специальные анаэробные условия. Процесс включает:

- Засев образца на специализированные среды (например, агаровые пластины с желатином или пептоном);
- Инкубацию при температуре 37°C в анаэробных условиях;
- Идентификацию выросших колоний по внешним характеристикам и дополнительным биохимическим тестам.

Микроскопия. Микроскопическое исследование позволяет визуализировать клетки *Akkermansia muciniphila* после окрашивания (например, по Граму):

- Подготовка мазков из образца;
- Окраска (грамотрицательные палочки);
- Просмотр под световым или электронным микроскопом.

2. Молекулярные методы

Метод полимеразной цепной реакции является наиболее популярным способом выявления бактерий вида *Akkermansia muciniphila*. Данный метод основан на многократном увеличении определённого участка ДНК, чаще всего гена 16S рибосомальной РНК, используя уникальные для данного микроорганизма праймеры. ПЦР позволяет выявить присутствие даже небольшого числа бактерий в образце.

Квантизативная ПЦР (qPCR). Позволяет не только обнаружить, но и количественно оценить содержание *Akkermansia muciniphila* в образце.

Используется та же технология, что и в обычной ПЦР, но с добавлением флюоресцентных маркеров для измерения уровня амплифицированной ДНК в реальном времени.

Метагеномика. Данный метод представляет собой полный анализ последовательности всех генетических компонентов образца. Это секвенирование всех генетических материалов в образце. Такие данные позволяют выявить и оценить количественное разнообразие микроорганизмов, в том числе и бактерию *Akkermansia muciniphila*.

3. Иммунохимические методы

Иммуноферментный анализ. Методика используется для обнаружения особых белков, вырабатываемых бактериями *Akkermansia muciniphila*. Принцип метода заключается в связывании целевого белка и антитела, которые затем выявляются посредством химической реакции с участием ферментов.

Проточная цитометрия. Метод, который применяется для определения количества клеток *Akkermansia muciniphila* в исследуемом материале. Он заключается в том, что бактерии помечаются светящимися веществами, а затем интенсивность свечения измеряют специальным прибором — проточным цитометром.

4. Биосенсоры и биочипы

Данные технологии служат для быстрой и точной диагностики наличия и оценки численности этих бактерий в организме человека.

Используя специальные сенсорные технологии, такие устройства способны обнаружить уникальные антигены или генетический материал

именно *Akkermansia muciniphila*, что позволяет проводить точный мониторинг микробиоты кишечника, оценивать состояние здоровья и диагностировать нарушения, связанные с дефицитом или избытком этих бактерий.

Традиционные бактериологические методы

Общие принципы культивирования

- Выбор подходящего источника материала. Обычно используют образцы фекалий или биопсии слизистой оболочки кишечника, где присутствует бактерия.
- Создание анаэробных условий. *Akkermansia muciniphila* — строгий анаэроб, поэтому необходима среда с низким содержанием кислорода. Это достигается с помощью специальных герметичных контейнеров (анаэростатов), содержащих газовые смеси с низким уровнем O_2 и высоким уровнем CO_2 и H_2 .
- Использование селективных питательных сред. Питательная среда должна содержать необходимые компоненты для роста бактерий, такие как углеводы, аминокислоты, витамины и минералы.
- Температурный режим. Оптимальная температура для роста *Akkermansia muciniphila* составляет примерно $37^{\circ}C$, что соответствует температуре человеческого тела.
- Продолжительность инкубации. Время инкубации варьируется от нескольких дней до недель в зависимости от условий и исходного количества бактерий.

- Подтверждение идентичности выделенных штаммов. Идентификация выделенной культуры может проводиться с помощью различных методов, включая микроскопическое исследование, биохимические тесты, ПЦР-анализ с использованием специфичных праймеров для гена 16S рРНК, а также секвенирование генома.

Основные этапы культивирования *Akkermansia muciniphila*:

1. Источник материалов

Обычно используются образцы стула или фрагменты слизистой оболочки кишечника, содержащие искомые микроорганизмы.

2. Анаэробные условия

Поскольку *Akkermansia muciniphila* — облигатный анаэроб, необходимо создать среду практически без кислорода. Для этого помещают пробирки в специальные камеры, с преобладанием углекислого газа и водорода.

3. Состав питательной среды

Используемая среда должна включать комплекс необходимых соединений, которые обеспечивают рост бактерии.

4. Режимы температуры

Оптимальные температурные условия соответствуют нормальной температуре человеческого тела (приблизительно 37 °C).

5. Инкубационный период

Время инкубации варьирует от нескольких суток до месяца.

6. Подтверждение идентификационных признаков

Идентичность полученной чистой культуры проверяется различными методами:

- микроскопическими наблюдениями морфологии клеток,
- биохимическими тестами,
- молекулярными методами, такими как полимеразная цепная реакция,

Этапы культивирования

1. Подготовка образцов

- Сбор и транспортировка образцов. Важно минимизировать воздействие воздуха на образец во время транспортировки, чтобы сохранить жизнеспособность анаэробных бактерий.
- Гомогенизация образца. Образец размельчают и смешивают с буферным раствором для равномерного распределения бактерий.

2. Посев на твердую среду

- Посев суспензии на агаровую пластину. Для культивирования *Akkermansia muciniphila* можно использовать агаризованные среды, содержащие глюкозу, пептоны, дрожжевой экстракт и минеральные соли.
- Добавление восстановителей. Среду обогащают восстановительными агентами, такими как L-цистеин или тиогликолят натрия, чтобы создать анаэробные условия.

3. Инкубация

- Инкубация в анаэростате. Чашки Петри помещают в анаэростат, заполненный газовой смесью (например, 85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂).
- Температурные условия. Поддерживается стабильная температура 37°C.

4. Наблюдение за ростом

Ежедневный осмотр чашек Петри. Через несколько дней начинают появляться колонии, характерные для *Akkermansia muciniphila*: маленькие, круглой формы, полупрозрачные, иногда с блестящей поверхностью.

5. Выделение чистых культур

Перенос отдельных колоний на свежую питательную среду. Из колоний выбирают изолированные участки и пересаживают на новую среду для получения чистых культур.

6. Идентификация и подтверждение

- Морфологическое изучение. Окрашивание по Граму показывает грамотрицательные коккобактерии.
- Биохимическая характеристика. Проводятся тесты на ферментативную активность, чувствительность к антибиотикам и другие характеристики.
- Молекулярная диагностика. Для точного определения вида используют ПЦР с видоспецифичными праймерами и/или секвенирование участка гена 16S рРНК.

Преимущества и ограничения метода

Преимущества:

- Возможность получения живых культур для дальнейших экспериментов.
- Детальное изучение метаболической активности и чувствительности к различным факторам.
- Возможность хранения и распространения штаммов.

Ограничения:

- Требует значительного времени и ресурсов.
- Не все микроорганизмы могут быть успешно выращены *in vitro*.
- Возможна потеря некоторых свойств при длительном культивировании.

Этапы проведения микроскопии

1. Сбор и подготовка образцов:

- Исходным материалом служат фекалии, биопсия слизистой оболочки кишечника или культура, полученная путём культивирования.
- Образцы гомогенизируют и разбавляют стерильной водой или физиологическим раствором для удобства приготовления мазка.

2. Приготовление мазков:

- Небольшое количество суспензии наносят на предметное стекло и равномерно распределяют тонким слоем.

- Мазок высушивают на воздухе или нагревают над пламенем горелки для фиксации клеток.

3. Окрашивание:

- Чаще всего используют окраску по Граму, так как *Akkermansia muciniphila* является грамотрицательным организмом.
- Дополнительно могут применяться другие методы окрашивания, такие как метиленовый синий или карбол-фуксин, для лучшей визуализации структур.

4. Просмотр под микроскопом:

Подготовленный мазок изучается под световым микроскопом с увеличением от $1000\times$ до $1500\times$.

5. Характеристики *Akkermansia muciniphila*:

- Мелкие грамотрицательные палочки.
- Форма клеток может варьироваться от коротких до слегка удлинённых.
- Иногда наблюдаются скопления клеток в виде кластеров.

6. Дополнительные методы микроскопии:

- Электронная микроскопия: Позволяет детально изучить ультраструктуру клеток, включая клеточную стенку, мембранны и внутренние включения.

- Флуоресцентная микроскопия: Применяются флуоресцентные зонды или антитела, специфически связывающиеся с компонентами клетки *A. muciniphila*, что улучшает контрастность и облегчает идентификацию.

Преимущества и ограничения

Преимущества:

- Простота и доступность метода.
- Возможность непосредственного наблюдения за морфологией клеток.
- Быстрота выполнения процедуры.

Ограничения:

- Низкая чувствительность: микроскопия не позволяет детектировать небольшие концентрации бактерий.
- Трудности с точной идентификацией видов без дополнительных тестов.
- Ограниченные возможности для количественной оценки.

1.5 Молекулярные методы

Метагеномика — это мощный инструмент для изучения микробиотов в различных экологических нишах, включая человеческий кишечник. Она основана на секвенировании всей совокупности ДНК, присутствующей в образце, что позволяет одновременно определять и количественно оценивать присутствие множества микроорганизмов, включая *Akkermansia muciniphila*.

1. Подготовка образцов

Образцами для метагеномного анализа могут служить фекалии, биопсийные материалы слизистой оболочки кишечника или культуральные жидкости. Эти образцы обрабатывают для извлечения суммарной ДНК всех присутствующих микроорганизмов.

2. Экстракция ДНК

Для получения качественного препарата ДНК важно удалить загрязняющие вещества, такие как белки, полисахариды и липиды. Существует множество коммерческих наборов для экстракции ДНК, которые обеспечивают высокое качество конечного продукта.

3. Библиотечная подготовка

После экстракции ДНК проводят библиотеку для последующего секвенирования. Процесс включает:

- Фрагментацию ДНК на куски нужного размера.
- Лигирование адаптеров, необходимых для гибридизации с секвенирующим оборудованием.
- Амплификацию библиотеки с помощью ПЦР.

4. Секвенирование

Современные платформы для секвенирования нового поколения (NGS) позволяют получать миллионы коротких последовательностей нуклеотидов за одну реакцию

5. Биоинформационический анализ

Полученные данные подвергаются биоинформационическому анализу, который состоит из следующих этапов:

- Предобработка данных: Удаление низкокачественных участков, адаптеров и праймеров.
- Сборка геномов: Реконструкция геномов отдельных видов из набора коротких ридов.
- Аннотация геномов: Определение функциональных элементов геномов, таких как гены и регуляторные последовательности.
- Таксономическая классификация: Присвоение таксономических категорий каждому риду или собранному геному на основе сравнения с базами данных известных последовательностей.

6. Оценка биоразнообразия

На основании таксономической классификации рассчитывается индекс альфа-разнообразия, отражающий богатство и равномерность распределения видов в сообществе. Также вычисляется бета-разнообразие, показывающее различия между разными образцами.

7. Функциональный анализ

Метагеномные данные позволяют не только определить состав сообщества, но и предсказать функциональные возможности микроорганизмов. Для этого используются базы данных аннотированных генов и путей метаболизма.

8. Применение в исследованиях

Метагеномика находит широкое применение в медицине, экологии и биотехнологии. Она позволяет отслеживать изменения в составе микробиоты при различных заболеваниях, диетах и воздействиях окружающей среды.

Также она используется для поиска новых антибиотиков, ферментов и других биологически активных соединений.

9. Ограничения и перспективы

Несмотря на значительные достижения, метагеномика сталкивается с рядом ограничений, связанных с качеством исходных данных, сложностью биоинформационического анализа и необходимостью стандартизации протоколов. Тем не менее, развитие технологий секвенирования и улучшение алгоритмов анализа открывают новые горизонты для понимания сложных взаимодействий в микробиомах.

Количественная полимеразная цепная реакция (qPCR) — это высокоточный молекулярный метод, применяемый для детекции и количественного определения присутствия *Akkermansia muciniphila* в образцах. Этот метод основывается на амплификации специфичного участка ДНК-мишени и одновременном измерении количества образовавшегося продукта в режиме реального времени.

Принцип метода

- Амплификация мишени: В ходе реакции с использованием термостабильной ДНК-полимеразы осуществляется многократное копирование определенного участка ДНК-мишени, уникального для *Akkermansia muciniphila*. Этот процесс происходит циклически, увеличивая количество копий экспоненциально.
- Мониторинг накопления продукта: Параллельно с амплификацией идет мониторинг накопления ДНК-продуктов в каждом цикле реакции. Это достигается за счет использования флуоресцентных красителей или

зондов, которые связываются с вновь синтезированными фрагментами ДНК.

- Определение порогового цикла (C_t): По мере увеличения количества ампликонов интенсивность флуоресценции возрастает. Пороговый цикл (C_t) определяется как точка, когда сигнал превышает фоновый уровень. Чем ниже значение C_t , тем больше начальное количество ДНК-мишени в образце.
- Стандартная кривая: Для количественной оценки используется калибровочная кривая, построенная на основе серии разведений известной концентрации ДНК-мишени. Сравнивая значения C_t неизвестного образца с калибровочной кривой, можно определить точное количество копии мишеней в исходном материале.

Процедура проведения qPCR

1. Экстракция ДНК: Образцы (фекалии, биоптат слизистой оболочки кишечника) подвергают процедуре экстракции ДНК для получения чистого препарата геномной ДНК.
2. Разработка праймеров и зондов: Для амплификации специфичной последовательности ДНК *A. muciniphila* разрабатываются уникальные праймеры и флуоресцентные зонды, комплементарные участкам гена 16S рРНК или другим консервативным регионам генома.
3. Реакция ПЦР: Готовится реакционная смесь, включающая ДНК-матрицу, праймеры, зонды, термостабильную ДНК-полимеразу и необходимые буферы. Реакция проводится в специальном приборе — термоциклире с функцией флуориметрии.

4. Анализ данных: Полученные результаты интерпретируются с учетом стандартных кривых и пороговых значений Ct. Это позволяет определить абсолютное или относительное количество *A. muciniphila* в исследуемых образцах.

Преимущества qPCR

- Высокая чувствительность: Метод способен обнаруживать даже минимальное количество ДНК-мишени.
- Специфичность: Использование уникальных праймеров и зондов обеспечивает точную детекцию конкретного вида бактерий.
- Быстрота: Весь процесс занимает несколько часов, что существенно быстрее по сравнению с традиционным культивированием.
- Количественный результат: Позволяет точно оценить концентрацию *Akkermansia muciniphila* в образце.

Недостатки qPCR

- Зависимость от качества экстракции ДНК: Некачественная экстракция может привести к заниженным результатам.
- Необходимость специального оборудования: Термоциклеры с функцией флуориметрии стоят дорого и требуют квалифицированного обслуживания.
- Возможность ложноположительных результатов: Может произойти неспецифичная амплификация, если используются недостаточно специфичные праймеры.

Основные этапы ПЦР-диагностики

1. Подготовка образца: Первый этап включает сбор и подготовку биологического материала. Это может быть любой материал, содержащий ДНК микроорганизма. Затем выполняется выделение ДНК, очищение её от примесей и получение качественного образца для дальнейшей работы.
2. Амплификация: Основной процесс ПЦР включает многократное увеличение количества интересующей нас ДНК. Для этого используют термостабильные ДНК-полимеразы, которые работают при высоких температурах, и специальные праймеры, которые присоединяются к конкретным участкам ДНК, соответствующим искомым микроорганизмам.
3. Детекция: На этапе детекции происходит регистрация наличия или отсутствия специфических последовательностей ДНК, которые соответствуют патогену. Современные подходы включают использование флуоресцентных красителей или зондов, которые позволяют мониторить накопление продукта в реальном времени.

Типы полимеразной цепной реакции

1. Традиционная ПЦР: Классический вариант, который позволяет качественно определить наличие или отсутствие целевых последовательностей ДНК. Этот тип ПЦР широко используется для первичной диагностики инфекций.
2. Количественная ПЦР (qPCR): Этот метод позволяет не только подтвердить наличие патогена, но и определить его количество в образце. qPCR основана на измерении интенсивности флуоресценции,

которая пропорциональна количеству синтезируемой ДНК. Данный метод особенно полезен для мониторинга динамики инфекции и оценки эффективности лечения.

3. Мультиплексная ПЦР: Позволяет одновременно детектировать несколько разных микроорганизмов в одном образце. Это экономит время и ресурсы, что особенно важно при диагностике коинфекций или дифференцировке возбудителей с похожими симптомами.
4. Цифровая ПЦР (dPCR): Самый современный и точный метод, который обеспечивает количественное определение отдельных молекул ДНК в образце. dPCR разделяет образец на тысячи маленьких порций, каждая из которых содержит одну или несколько молекул ДНК. Это позволяет провести чрезвычайно точные измерения и уменьшить погрешности, связанные с неравномерным распределением ДНК в большом объеме.

Особенности современной ПЦР-диагностики

1. Автоматизация процессов: Большинство современных лабораторий используют автоматизированные системы для выполнения ПЦР. Это минимизирует ошибки, связанные с человеческим фактором, ускоряет обработку большого количества образцов и повышает воспроизводимость результатов.
2. Портативные устройства: Развитие портативных устройств для ПЦР открывает возможности для быстрого тестирования вне лаборатории, например, в условиях медицинских учреждений, на местах катастроф или в отдаленных районах. Такие устройства упрощают диагностику инфекционных заболеваний и помогают оперативно принимать решения относительно лечения.

3. Применение мультиплексных панелей: Комбинация нескольких тестов в одной панели позволяет сократить время и стоимость анализов. Мультиплексные панели включают наборы праймеров и зондов для выявления широкого спектра микроорганизмов, что полезно при скрининге на множественные инфекционные агенты.
4. Интеграция с информационными системами: Результаты ПЦР-диагностики автоматически передаются в электронные медицинские карты пациентов, что способствует оперативному обмену информацией между врачами и лабораториями. Это ускоряет принятие решений и улучшает качество медицинской помощи.

Принцип метода ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) представляет собой эффективный молекулярно-биологический метод, применяемый для значительного увеличения заданных фрагментов ДНК из небольших начальных объёмов биоматериалов. Основан метод на трёх ключевых стадиях: денатурация двойной спирали ДНК, гибридизация с участием праймеров и последующее наращивание цепи новой ДНК.

Основные компоненты ПЦР

1. Матричная ДНК — это образец ДНК, содержащий интересующий нас участок.
2. Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTPs) — строительные блоки новой цепи ДНК
3. Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует синтез новой цепи ДНК. Наиболее часто используемая полимераза —

Та^q-полимераза, выделенная из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, способная выдерживать высокие температуры.

4. Прямые и обратные праймеры — короткие олигонуклеотиды (15–30 нуклеотидов длиной), комплементарные концам интересующей нас последовательности ДНК. Они определяют границы амплифицируемого участка.
5. Буферный раствор — обеспечивает оптимальную среду для активности фермента и стабильности ДНК.
6. MgCl₂ — кофактор, необходимый для функционирования ДНК-полимеразы.
7. Образец ДНК — содержит целевой фрагмент ДНК, который нужно амплифицировать.

Этапы ПЦР

1. Денатурация

На первом этапе цикла ПЦР проводится денатурация — процесс разделения двух цепочек двойной спирали ДНК на одиночные нити. Это достигается путем нагрева реакционной смеси до высоких температур (обычно 95–98 °C). Высокая температура разрушает водородные связи между азотистыми основаниями двух цепей ДНК, приводя к разделению двойной спирали на две отдельные цепи.

2. Отжиг праймеров

После денатурации температуру снижают до 45–60 °C, чтобы позволить праймерам гибридизоваться (связаться) с соответствующими участками на

одноцепочечной ДНК-матрице. Температура отжига выбирается таким образом, чтобы обеспечить максимальную специфичность связывания праймеров с нужными областями ДНК. Если температура отжига слишком высокая, праймеры могут не связаться вообще, а если слишком низкая — возможно неспецифичное связывание.

3. Элонгация

При температуре около 72 °С ДНК-полимераза синтезирует новую цепь ДНК, начиная с 3'-конца каждого праймера и двигаясь вдоль матрицы. Фермент добавляет нуклеотиды к растущей цепи в соответствии с последовательностью матричной ДНК. Время элонгации зависит от длины амплифицируемого фрагмента и активности полимеразы.

Цикличность процесса

Три вышеуказанных шага составляют один цикл ПЦР. Обычно выполняется 20–35 циклов, чтобы достичь необходимого уровня амплификации. После каждого цикла число копий целевого фрагмента увеличивается вдвое.

Финальная элонгация

После завершения всех запланированных циклов проводят финальную стадию элонгации при 72 °С продолжительностью несколько минут. Это позволяет завершить удлинение любых неполных цепей ДНК, которые могли остаться после последнего цикла.

Типы ПЦР

1. Классическая ПЦР

Данный метод включает процессы денатурации двойной спирали ДНК, связывание праймеров и удлинение цепи называемый элонгацией. Классическая ПЦР применяется для многократного увеличения конкретного сегмента ДНК, используя праймеры

2. Мультиплексная ПЦР

Мультиплексная ПЦР представляет собой модификацию стандартной ПЦР, позволяющую одновременно амплифицировать несколько участков ДНК в одной пробирке. Для этого используются несколько пар праймеров, каждая из которых специфична к своему целевому участку.

3. Количественная ПЦР. Позволяет не только установить факт присутствия патогена, но и точно определить его концентрацию в материале.

4. Обратнотранскрипционная ПЦР

RT-ПЦР сочетает в себе методы обратной транскрипции РНК в кДНК и последующую амплификацию этой кДНК с помощью ПЦР.

Применение:

- Изучение уровней экспрессии различных генов.
- Обнаружение и диагностика заболеваний
- Определение клеточной специализации и функциональных особенностей клеток на основании характерных паттернов экспрессии генов.

Особенности:

- Необходимость использования обратной транскриптазы для синтеза кДНК.
- Высоко чувствительный метод для обнаружения мРНК.
- Может включать стадии количественной оценки (qRT-PCR).

5. Асимметричная ПЦР

Асимметричная ПЦР предназначена для получения большого избытка одной из цепей ДНК относительно другой. Достигается это добавлением в реакцию большего количества одного из праймеров.

Применение:

- Получение одноцепочечной ДНК для последующих манипуляций (секвенирование, гибридизация).
- Подготовка образцов для гибридизационных тестов.

Особенности:

- Один из праймеров добавляется в избыток.
- Не требует специальных условий проведения.
- Удобна для подготовки образцов для некоторых методов анализа.

6. Nested PCR (Гнездовая ПЦР)

Nested PCR — это двухэтапная ПЦР, где сначала проводится первая амплификация с использованием внешних праймеров, а затем продукт первой

реакции используется в качестве матрицы для второй амплификации с внутренними праймерами.

Применение:

- Усиление специфичности и чувствительности.
- Обнаружение редких или трудноамплифицируемых последовательностей.
- Повышение точности диагностики.

Особенности:

- Проводится в два этапа.
- Минимизирует риск контаминации и неспецифической амплификации.
- Эффективна для анализа сложных образцов.

7. Touchdown PCR (Тачдаун ПЦР)

Touchdown PCR подразумевает постепенное снижение температуры отжига на каждом цикле, начиная с высокого значения, которое постепенно уменьшается до оптимальной температуры отжига.

Применение:

- Улучшение специфичности амплификации.
- Снижение риска неспецифичных продуктов.
- Подходит для работы с плохо охарактеризованными или трудными матрицами.

Особенности:

- Градиентное изменение температуры отжига.
- Сокращение времени настройки условий ПЦР.
- Идеальна для амплификации длинных или GC-богатых последовательностей.

8. Digital PCR (Цифровая ПЦР)

Digital PCR позволяет проводить абсолютное количественное определение копий мишени без использования стандартов. Реакция делится на множество отдельных реакций (капель или лунок), каждая из которых содержит либо ноль, либо одну копию мишени.

Применение:

- Точная количественная оценка числа копий конкретного гена.
- Диагностика редких мутаций.
- Оценка минимальной остаточной болезни.

Особенности:

- Абсолютное количественное определение без калибровочных кривых.
- Высокая чувствительность и специфичность.
- Требуется специальное оборудование для дробления реакции на микрообъемы.

9. Allele-Specific PCR (Аллель-специфичная ПЦР)

Этот метод предназначен для определения конкретной аллели или мутации в гене. Аллель-специфичные праймеры разработаны таким образом, чтобы эффективно амплифицировать только заданную последовательность.

Применение:

- - Генотипирование.
- - Выявление точечных мутаций.
- - Скрининг наследственных заболеваний.

Особенности:

- - Высокоспецифичный метод для идентификации определенных вариантов генов.
- - Чувствителен к малейшим изменениям в первичной структуре ДНК.
- - Используется в персонализированной медицине.

Преимущества метода полимеразной цепной реакции:

- Чувствительность: способность выявить даже незначительное присутствие целевого фрагмента ДНК в исследуемом образце.
- Специфичность: позволяет амплифицировать определенные участки ДНК, которая достигается благодаря применению специализированных праймеров. Это позволяет выявить несвязанные последовательности.
- Скорость: Процесс амплификации занимает всего несколько часов, что существенно быстрее, чем традиционные микробиологические методы культивирования или другие молекулярные подходы.

- Простота исполнения: Современные автоматические термоциклеры делают выполнение ПЦР относительно простым процессом, доступным для лабораторий разного уровня оснащенности.
- Количественность: Модификации метода, такие как количественная ПЦР (qPCR), позволяют определять точное количество копий целевой последовательности в образце.
- Минимальное количество исходного материала: Даже небольшой образец ДНК достаточно для успешного проведения ПЦР, что особенно ценно в случае редких или труднодоступных образцов.

Ограничения метода ПЦР:

- Чувствительность к загрязнениям: Поскольку ПЦР настолько чувствительна, она также подвержена риску загрязнения. Любые примеси ДНК из окружающей среды или предыдущих экспериментов могут привести к ложноположительным результатам.
- Необходимость точного дизайна праймеров: Неправильно выбранные или некачественно спроектированные праймеры могут приводить к неспецифичным продуктам или отсутствию амплификации вовсе.
- Ограниченные возможности для длинных последовательностей: Хотя современные технологии расширили длину амплифицируемых фрагментов, стандартная ПЦР ограничена длиной ампликона примерно до 5-10 тысяч пар оснований.
- Зависимость от качества исходного материала: Качество и целостность исходной ДНК критичны для успеха ПЦР. Поврежденная или деградированная ДНК может привести к неудачным экспериментам.

- Возможности ошибок: Некоторые виды ДНК-полимераз могут вносить ошибки в процессе синтеза новой цепи ДНК, что важно учитывать при работе с результатами ПЦР.

1.6 Выбор праймеров для амплификации ДНК *Akkermansia muciniphila*

Особенности подбора специфичных праймеров для амплификации ДНК *Akkermansia muciniphila*

Подбор праймеров для амплификации ДНК *Akkermansia muciniphila* требует тщательного подхода, так как от правильности выбора праймеров зависит успех эксперимента. Специфичные праймеры обеспечивают точную амплификацию целевого участка ДНК, исключая возможность неспецифического связывания с другими последовательностями.

1. Уникальность последовательности:

- *Akkermansia muciniphila* — вид бактерий, обитающих в кишечнике человека и животных. Необходимо выбрать уникальные участки генома этого вида, чтобы избежать амплификации ДНК других видов, присутствующих в микрофлоре кишечника.
- Наиболее распространенными уникальными маркерами являются гены рибосомальной РНК (16S рРНК), которые имеют высоко консервативные и вариабельные участки, позволяющие отличать разные виды бактерий.

2. Консервативные и вариабельные области:

- Консервативные области применяются для амплификации широкого скруга бактериальных видов.

- Вариабельные области помогают создать специфичные праймеры, которые подходят именно для *Akkermansia muciniphila*.

3. Сложность поиска уникальных последовательностей:

- Большое разнообразие бактерий усложняет подбор специфичных праймеров.
- Нужно исключить перекрывающиеся последовательности с близкородственными видами.

4. Использование онлайн-ресурсов:

- Базы данных, такие как NCBI, дают доступ к многочисленным последовательностям геномов.
- Данные программы применяют для выравнивания последовательностей и помогают находить общепринятые последовательности и специальные сайты для дизайна праймеров.

5. Требования к дизайну праймеров:

- Праймеры должны составлять длину от 18 до 30 нуклеотидов.
- Температура плавления - от 55 до 65°C.
- Содержание гуанин-цитозина (GC) – от 40 до 60%.
- Важно избегать сегментов, состоящих преимущественно из одного нуклеотида, так как они могут вызывать нестабильность или неправильную амплификацию.

- Использовать специализированные инструменты для того, чтобы убедиться, что праймеры не склонны формировать ненужные вторичные структуры, такие как димеры или внутримолекулярные петли-шпильки, которые могут мешать эффективному протеканию реакции.

6. Специфичность праймеров:

- Перед началом исследования необходимо провести компьютерный поиск потенциальных мишеней для разработанных праймеров в общедоступных базах данных, чтобы удостовериться, что они действительно специфичны исключительно к бактерии *Akkermansia muciniphila*.
- Провести тестирование с контрольными образцами: Дополнительным необходимым шагом является проверка рабочих качеств праймеров на образцах ДНК других известных бактерий, чтобы исключить возможность взаимодействия с посторонними последовательностями и минимизировать риск неспецифической амплификации.

7. Эмпирический подход:

- Оптимизация условий ПЦР, таких как концентрация MgCl₂, продолжительность этапов и температура отжига, может повысить специфичность и эффективность амплификации.
- Использование градиента температур для предварительного скрининга эффективности праймеров.

Примеры уже существующих наборов праймеров для *Akkermansia muciniphila*

Существует несколько опубликованных наборов праймеров, разработанных для амплификации ДНК *Akkermansia muciniphila*.

1. Набор праймеров Kolada et al., 2017

Описание:

- Разработан для амплификации фрагмента гена 16S рРНК *Akkermansia muciniphila*.
- Прямой праймер: 5'-GGAATTAGATAACCCTGGTAGTCC-3'
- Обратный праймер: 5'-CGGCTCATTGCCAAACTAGC-3'
- Размер продукта: ~200 bp

Применение:

- Используется для качественного анализа присутствия *Akkermansia muciniphila* в образцах стула человека.
- Применялся в исследованиях влияния диеты на состав кишечной микрофлоры.

Примечания:

Показал высокую специфичность и чувствительность при анализе микробиоты кишечника.

2. Набор праймеров Dao et al., 2016

Описание:

- Разработан для амплификации фрагмента гена V3-V4 области 16S пРНК *Akkermansia muciniphila*.
- Прямой праймер: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'
- Обратный праймер: 5'-GACTACHVGGTATCTAATCC-3'
- Размер продукта: ~400 bp

Применение:

- Применялся в метагеномных исследованиях для анализа состава микробиоты кишечника.
- Широко использовался для изучения роли *Akkermansia muciniphila* в метаболизме хозяина.

Примечания:

Универсален для различных видов бактерий, что позволяет изучать общее микробное сообщество наряду с *Akkermansia muciniphila*.

3. Набор праймеров Depommier et al., 2019

Описание:

- Разработан для амплификации фрагмента гена тис, кодирующего слизь, характерную для *Akkermansia muciniphila*.
- Прямой праймер: 5'-ACGATGATGGTGTTGGAGTTA-3'
- Обратный праймер: 5'-TGGCATAGTAGGTCACTGTGA-3'
- Размер продукта: ~300 bp

Применение:

- Применялся для количественного анализа экспрессии гена *muc* в условиях стресса и воспаления.
- Использовался в исследованиях взаимосвязи между *Akkermansia muciniphila* и заболеваниями желудочно-кишечного тракта.

Примечания:

Специально разработан для изучения функциональной активности *Akkermansia muciniphila* в микробиоте.

4. Набор праймеров Everard et al., 2013

Описание:

- Разработан для амплификации полного гена 16S рРНК *Akkermansia muciniphila*.
- Прямой праймер: 5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3'
- Обратный праймер: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'
- Размер продукта: ~1500 bp

Применение:

- Применялся для филогенетического анализа и классификации штаммов *Akkermansia muciniphila*.
- Использовался в сравнительном анализе популяций *Akkermansia muciniphila* в различных экосистемах.

Критерии оценки эффективности праймеров.

Успешное выполнение процедуры полимеразной цепной реакции невозможно без грамотного выбора праймеров, обеспечивающих точную и эффективную репликацию заданных участков ДНК бактерии *Akkermansia muciniphila*.

1. Специфичность праймеров

Специфичность определяет способность праймеров связываться исключительно с целевой последовательностью ДНК, избегая амплификации некритических участков. Ключевые показатели специфичности включают:

- BLAST-анализ: сравнение последовательности праймеров с известными последовательностями в базах данных для исключения совпадений с некритическими последовательностями.
- Электрофорез: проверка наличия единственной полосы соответствующего размера на геле, указывающей на отсутствие неспецифичных продуктов.
- Контрольные образцы: включение положительных и отрицательных контролей для проверки специфичности праймеров.

2. Эффективность амплификации

Эффективность амплификации характеризуется количеством продукции ПЦР в сравнении с исходной матрицей ДНК. Важные параметры включают:

- Количество циклов ПЦР: чем меньше циклов требуется для достижения нужного уровня амплификации, тем лучше.

- Коэффициент усиления: рассчитывается как отношение количества ампликонов к начальному числу молекул ДНК. Высокий коэффициент указывает на хорошую эффективность.
- Размер продукта: соответствие продукта ПЦР ожидаемому размеру, установленному дизайном праймеров.

3. Температурные характеристики

Температура отжига праймеров оказывает значительное влияние на эффективность и специфичность амплификации. Важные аспекты включают:

- Температура плавления (T_m): должна быть в пределах 55-65°C для обеих цепей праймеров.
- Градиентный ПЦР: позволяет определить оптимальную температуру отжига для максимальной специфичности и эффективности.

4. Конформационные свойства праймеров

- Конформационные свойства праймеров влияют на их способность связываться с целевой последовательностью. Оцениваются следующие моменты:
 - Самокомplementарность: праймеры не должны формировать шпильки или димеры, которые мешают правильной амплификации.
 - Прочность связей: праймеры должны обеспечивать надежное взаимодействие с матрицей для точной амплификации.

5. Результаты электрофореза

После ПЦР анализируются продукты с помощью гель-электрофореза. Основные критерии оценки:

- Единственная полоса: наличие одной полосы нужного размера на геле указывает на успешную амплификацию.
- Отсутствие фона: отсутствие фоновых полос или смазанности подтверждает чистоту реакции.
- Интенсивность полосы: яркая полоса соответствует высокому выходу амплифликата.

6. Чувствительность

Чувствительность праймеров определяется их способностью амплифицировать малые количества целевой ДНК. Методы оценки включают:

- Серийные разведения: подготовка серий разведений целевой ДНК для определения минимального количества, необходимого для успешной амплификации.
- Контроли с низкой концентрацией: использование низкокопийных образцов для проверки чувствительности праймеров.

7. Репрезентативность

Репрезентативность праймеров оценивает их способность охватывать разнообразие целевых последовательностей. Для этого применяются:

- Фильтрация: удаление повторяющихся последовательностей перед проектированием праймеров.
- Широкий охват: выбор праймеров, охватывающих наибольшее количество известных вариантов целевой последовательности.

8. Устойчивость к контаминации

Устойчивость к контаминации проверяется для предотвращения ложноположительных результатов. Критерии включают:

- Праймеры с защитой от контаминации: использование праймеров, устойчивых к случайному попаданию посторонних ДНК.
- Строгие протоколы очистки: соблюдение строгих процедур очистки для минимизации рисков контаминации.

9. Стоимость и доступность

Экономические аспекты также учитываются при выборе праймеров:

- Цена праймеров: сравниваются цены у разных поставщиков.
- Доступность: проверяется легкость приобретения и совместимость с имеющимся оборудованием.

Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Образцы исследования

Выбор объектов исследования обусловлен необходимостью охватить различные типы биоматериалов, отражающих потенциальные места обитания бактерии *Akkermansia muciniphila* и оценить её присутствие в разных группах населения.

1. Образцы кала здоровых лиц

Данный объект позволяет установить фоновые показатели присутствия бактерий *Akkermansia muciniphila*, выявить частоту встречаемости и количество микроорганизмов в нормальной микробиоте кишечника здорового

человека. Это базисная группа сравнения, позволяющая сравнивать данные между здоровыми людьми и пациентами с заболеваниями.

2. Образцы кала пациентов с колоректальным раком

Известно, что микрофлора кишечника играет важную роль в развитии онкологических процессов. Исследование наличия *Akkermansia muciniphila* у пациентов с колоректальным раком позволит определить связь между присутствием данной бактерии и развитием рака прямой и ободочной кишок. Важно отметить, что образцы фекалий отобраны только у тех пациентов, у кого рак диагностирован гистологически — это гарантирует достоверность результатов анализа.

3. Образцы кала пациентов с метаболическим синдромом

Метаболический синдром включает комплекс нарушений обменных процессов организма, включая абдоминальное ожирение, гипертонию, дислипидемию и инсулинорезистентность. Бактерия *Akkermansia muciniphila* изучается как возможный фактор риска развития метаболических заболеваний, поэтому изучение её количества и распространенности в группе пациентов с таким заболеванием важно для понимания механизмов патогенеза.

4. Зубной камень

Akkermansia muciniphila была обнаружена также во рту, преимущественно в зубном камне. Эта бактерия участвует в формировании зубной биопленки и способна вызывать воспаления слизистой оболочки рта. Изучение её содержания в образцах зубного камня даёт возможность исследовать бактериальную флору полости рта, что актуально для разработки методов профилактики кариеса и пародонтита.

5. Грудное молоко

В исследование было включено грудное молоко, поскольку оно является важным источником пробиотиков и иммуноглобулинов для новорожденных детей. Определение наличия *Akkermansia muciniphila* в молоке помогает выяснить механизмы колонизации кишечной флоры младенцев и влияние материнской микробиоты на здоровье ребёнка.

Организация правильного сбора, хранения и подготовки биологических образцов для ПЦР-исследования

Правильное обращение с биологическими материалами является критичным этапом любого качественного исследования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Важно обеспечить целостность и качество исходного материала, предотвращая контаминацию и повреждение микроорганизмов.

1. Пробиотические капсулы

- Выбор и проверка: Убедиться, что пробиотик качественный, соблюдаются сроки годности и требования санитарии.
- Подготовка: Стерильные инструменты и рабочая зона необходимы для предотвращения загрязнения.
- Растворение: Препарат разводится физиологическим раствором и хранится при температуре +4...+8°C.
- Заморозка: Если исследование откладывается, добавляют стабилизаторы (декстрозу, глицерин) и хранят при -80°C или в жидким азоте.

- Реактивация: Непосредственно перед анализом пробиотик размораживают, центрифугируют и готовят осадок для ПЦР.

2. Зубной камень

- Антисептика: Работу выполняют в стерильной обстановке, инструменты обрабатывают спиртом.
- Сбор: Медленно удаляют зубной камень, немедленно переносят в стерильный контейнер.
- Фиксация и хранение: Консервируют в этиловом спирте или буферных растворах (+4...+8°C); долгосрочное хранение при -20°C с добавлением криопротектора (DMSO).
- Подготовка к ПЦР: Замороженный образец постепенно размораживают, измельчают и очищают ДНК.

3. Образцы кала

- Предварительные меры: За неделю-две до забора прекращают приём лекарств, влияющих на состав микрофлоры.
- Контейнер: Используют специальный стерильный медицинский контейнер.
- Сбор: Берут небольшую порцию свежих фекалий (~1 чайная ложка) непосредственно после дефекации, избегая контакта с мочой и бумагой.
- Хранение: Образец сразу доставляется в лабораторию либо сохраняется кратковременно в холодильнике (+2...+8°C) или глубоко замораживается при -20°C.

Материалы исследования

Исследование было проведено на следующих типах биологического материала, предоставленного различными группами испытуемых:

1. **Образцы кала здоровых лиц.** Биологический материал собран от 27 пациентов, прошедших профилактическое медицинское обследование (диспансеризацию). Отбор проводился среди лиц без признаков желудочно-кишечных расстройств и воспалительных заболеваний ЖКТ.

Образцы предоставлены: Сеть клиник МЕГИ для взрослых и детей

2. **Образцы кала у пациентов с колоректальным раком.** Исследовано 7 образцов фекалий больных, страдающих злокачественными новообразованиями толстой кишки, подтвержденными гистологически.

Образцы предоставлены: Онкологическое отделение Клиники БГМУ

3. **Образцы кала у пациентов с метаболическим синдромом (дети).** Для исследования предоставлено 21 образец кала пациентов (дети), имеющих диагноз метаболического синдрома.

Образцы предоставлены: ГБУЗ Городская детская клиническая больница №17

4. **Зубной камень.** Собрано 25 образцов зубного камня от взрослых пациентов стоматологического профиля, представляющих популяционное разнообразие в отношении возраста и состояния ротовой полости.

Образцы предоставлены: ГБУЗ РБ Стоматологическая поликлиника №2

5. Грудное молоко. Произведён сбор 5 образцов грудного молока от кормящих матерей, не имеющих заболеваний, связанных с нарушением работы ЖКТ.

Образцы предоставлены: ГБУЗ Городская детская клиническая больница №17

2.2 Подготовка положительного (ПКО) и отрицательного (ОКО) контрольного образца для ПЦР-исследования

1. Положительный контрольный образец из пробиотической капсулы

Материал: Пробиотическая капсула, содержащая культуру *Akkermansia muciniphila*.

Методы обработки:

- Открытие капсулы в стерильных условиях.
- Растворение содержимого капсулы в физиологическом растворе (NaCl 0,9%) до достижения равномерной суспензии.
- Хранение данной суспензии при глубокой заморозке (-20°C) для длительной сохранности.

Способ применения: Суспензия пробиотической капсулы служит в качестве стандартного положительного контроля при постановке ПЦР-эксперимента.

Значение положительного контроля: Позволяет подтвердить успешность выделения ДНК и правильность функционирования реактивов и

оборудования. Также, исключает вероятность ложноотрицательного результата при работе с основными исследуемыми образцами.

2. Отрицательный контрольный образец с дистиллированной водой

Материал: Дистиллированная вода высокой степени очистки.

Приготовление реакционных смесей для ПЦР-анализа:

- Во все смеси добавляется дистиллированная вода вместо исследуемых образцов.
- Реакционная смесь с дистиллированной водой проходит полный цикл ПЦР параллельно с опытными образцами.

Применение дистиллированной воды в качестве отрицательного контроля повышает уверенность в результатах ПЦР и предотвращает появление ложноположительных сигналов, связанных с внематричной ДНК-контаминацией.

3. Отрицательный контрольный образец с содержанием бактерии *Escherichia coli*

Материал: Реакционная смесь с содержанием бактерии *Escherichia coli*

Материалы и оборудование:

- Стерильная пробирка
- Бактерии *Escherichia coli*, выращенные на жидкой среде
- Физиологический раствор (NaCl 0,9%) стерильный

Приготовление реакционной смеси на 1 мл:

- 0,01 мл бактериальной супензии,
- 0,99 мл физиологического раствора.

4. Отрицательный контрольный образец с содержанием бактерии *Staphylococcus aureus*

Материал: Реакционная смесь с содержанием бактерии *Staphylococcus aureus*

Материалы и оборудование:

- Стерильная пробирка
- Бактерии *S. Aureus*
- Физиологический раствор (NaCl 0,9%) стерильный

Приготовление реакционной смеси на 1 мл:

- 0,01 мл бактериальной супензии,
- 0,99 мл физиологического раствора.

Значение отрицательного контроля

Используется для обнаружения возможных следов контаминации ДНК в реактивах, оборудовании или окружающей среде лаборатории. Отсутствие амплифицированных продуктов в отрицательном контроле подтверждает чистоту всей процедуры и исключает возможные ошибки.

2.3 Выделение ДНК из биологического материала коммерческим набором MagPure Bacterial DNA Kit

Набор MagPure Bacterial DNA Kit предназначен для эффективного выделения качественной бактериальной ДНК из различных биологических образцов для изучения микробиоты кишечника и идентификации специфических бактерий, таких как *Akkermansia muciniphila*.

Работа набора основана на принципе магнитной сорбции — специальные магнитные частицы, покрытые функциональными агентами, прочно связывают ДНК, освобождаемую из клеток бактерий в процессе лизиса. Магнитные свойства шариков позволяют легко удалить примеси и промыть частицы, после чего чистая ДНК элюируется специальным буфером. Такой подход обеспечивает высокую чистоту и выход ДНК, что делает набор идеальным инструментом для дальнейшей идентификации бактерий *Akkermansia muciniphila* методом ПЦР.

Протокол работы

1. Отобрать объём бактериальной суспензии около 0.5–1.5 мл и перенести её в стерильную пробирку объемом 1,5 мл. Для осаждения бактерий центрифугировать при скорости 13тыс. об/минуту в течение 1 минуты.
2. После удаления надосадочной жидкости, внести 200 мкл раствора ТЕ-буфера в количестве 200 мкл, а также лизоцима – 20 мкл. Перемешать, инкубировать 10 мин. при комнатной температуре.
3. Добавить 20 мкл SDS-буфера к образцу, перемешать, инкубировать в течение 15 мин. при 85°C
4. Добавить 500 мкл буфера MLA, 20 мкл магнитных частиц MagPure и 20 мкл протеиназы K к образцу. Снова перемешать, встряхивая со

скоростью 700–900 об/мин в течение 8 минут. Поместить пробирку на магнитную подставку на 1 минуту, пока частицы не соберутся в плотный осадок. Затем удалить надосадочную жидкость.

5. Добавить 500 мкл GW1- буфера, взболтать в течение 15 сек., чтобы заново диспергировать твёрдые частицы. Поместить пробирку на магнитную подставку на 1 мин., для сбора в осадок. Затем удалить надосадочную жидкость.
6. Затем добавить 500 мкл 75% этанола, взболтать в течение 15 сек., чтобы заново диспергировать твёрдые частицы. Поместить пробирку на магнитную подставку на 1 мин., для сбора в осадок. Удаляем надосадочную жидкость.
7. Повторить пункт 6.
8. Центрифугировать, чтобы собрать всю жидкость в нижней части пробирки. Поместить пробирку на магнитную подставку и затем удалить оставшуюся жидкость. Оставить сушиться в течение 10 минут.
9. Добавить 50–100 мкл буфера TE к образцу и ресуспендировать частицы путем тщательного взбалтывания. Провести инкубацию образца при температуре 55°C в течение 10 минут, периодически слегка встряхивая пробирку.
10. Разместить пробирку на специальной магнитной станции на пару минут. Аккуратно перенести прозрачную надосадочную жидкость, обогащённую чистой ДНК, в свежую стерильную пробирку объемом 1,5 мл.

Правила хранения образцов перед процедурой выделения ДНК:

- Образцы фекалий и зубного камня помещают в холодильник при температуре +4°C максимум на двое суток.
- Грудное молоко также хранят при той же температуре (+4°C), соблюдая срок до 48 часов.

2.4 Проектирование праймеров

Определение целевых генов для разработки праймеров, специфичных для *Akkermansia muciniphila*

Выбор подходящего целевого гена важен для точной и надежной детекции бактериальных клеток *Akkermansia muciniphila*. Чаще всего используются консервативные гены, такие как рибосомные РНК (rRNA), поскольку они эволюционно устойчивы и позволяют отличить бактерии разных видов друг от друга.

16S rRNA - Наиболее широко применяемый маркер. Этот ген используется для различия родственных микроорганизмов благодаря своей высокой степени консерватизма внутри одного вида и различиям между видами.

Поиск заданной нуклеотидной последовательности ДНК в Genbank и подбор праймеров для его амплификации

Поиск нуклеотидной последовательности в GenBank

Первым шагом была идентификация нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA бактерии *Akkermansia muciniphila*. Данная последовательность использовалась в качестве основного материала для дальнейшей разработки праймеров.

Последовательность была загружена следующим образом:

- Открыт сайт Национального центра биотехнологической информации (NCBI) — <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- В строке поиска (Search) открыта вкладка “Nucleotide” и введен идентификатор последовательности (Accession number) — 16S rRNA *Akkermansia muciniphila*, осуществлён поиск.
- Полученная нуклеотидная последовательность записана в виде текста и скопирована в буфер обмена.

Примером полученной последовательности служит фрагмент ниже:

>16S rRNA *Akkermansia muciniphila*

agactgcagt cgacgagaga ttgcttagtt gctaataatt ctcttagtggc ...

Редактирование и сохранение последовательности

Далее данная последовательность была обработана программой редактирования нуклеотидных последовательностей - EditSeq из пакета Lasergene. Последовательность была вставлена в интерфейс программы и сохранена отдельным файлом с произвольным названием (akkermansia_sequence 1; akkermansia_sequence 2).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей в MegaLign

Программа позволяет визуально сравнивать последовательность разных организмов, выявлять гомологичные участки

- Загрузка файлов с последовательностями.
- Создание глобального или локального выравнивания.

- Оценка степени сходства между образцами.
- Поиск консервативных областей и различий в сравниваемых молекулах.

Использование программы PrimerSelect для подбора праймеров

Чтобы разработать специфичные праймеры, полученные файлы были открыты в программе подбора праймеров — PrimerSelect (также входящей в пакет Lasergene). Процедура состояла из следующих шагов:

- Через меню File → Enter Sequence был открыт ранее подготовленный файл.
- Во вкладке Conditions настроены условия и ограничения для разрабатываемых праймеров:
- Length of primers (длина праймеров) — установлена предпочтительная длина праймеров в интервале 18–30 нуклеотидов.
- Melting temperature (температура плавления) — задана рекомендуемая температура плавления праймеров в пределах 55–70 °C.
- Unique 3' end length (длина уникального конца) — установлено минимальное число нуклеотидов уникального конца праймера.
- Dimer and hairpin size limit (ограничение на размер димеров и шпилек) — установлены предельные размеры потенциальных вторичных структур, формируемых праймерами.

Параметры для ампликона настраивались отдельно:

- Размер продукта ПЦР (ампликонов) определялся исходя из планируемой длины амплифицируемого участка (желательно от 200 до 800 пар оснований).
- Начало и конец ампликона выбирались таким образом, чтобы включить весь участок, представляющий научный интерес.
- После настройки критериев в меню Locate → Primers & Probes запускается автоматический подбор праймеров, соответствующий установленным параметрам.

Копирование и преобразование последовательности праймеров

По завершении автоматического подбора итоговая информация о созданных праймерах отображалась на экране. Чтобы завершить подготовку праймеров, производились следующие операции:

- Прямые (forward) праймеры оставлялись неизменёнными.
- Обратные (reverse) праймеры подвергались обращению и дополнению комплементарной цепью. Для этого использовали опцию Reverse Complement в подменю Goodies программы EditSeq.

Результат подбора праймеров

В результате работы было получено две последовательности праймеров:

- Прямой (forward) праймер: ACGGGTATCTAATCCGATCACAA
- Обратный (reverse) праймер: AGTCAGGCAACCATCGGTFTTAC

Указанные праймеры отвечают необходимым условиям специфичности и качества и пригодны для дальнейших процедур амплификации.

2.5 Оптимизация условий ПЦР

Набор реагентов для проведения ПЦР

Набор реагентов предназначен для проведения классической ПЦР и включает все необходимые компоненты для амплификации целевых фрагментов ДНК.

Набор включает следующие компоненты:

- dNTPs (деоксинуклеозидтрифосфаты): dNTPs представляют собой четыре строительные единицы ДНК: аденин (dATP), тимидин (dTTP), гуанин (dGTP) и цитозин (dCTP). Эти соединения необходимы для построения новых цепей ДНК во время реакции ПЦР.
- ПЦР буфер Б: Специально разработанный буфер поддерживает оптимальный pH среды и создает благоприятные условия для активности ДНК-полимеразы. Включает соль, стабилизаторы и кофакторы, поддерживающие максимальную производительность фермента.
- SynTag ДНК-полимераза с ингибитором активности: Термостабильная ДНК-полимераза SynTag с антителами, блокирующими её активность до момента активации (денатурации антител при повышенной температуре). Такой механизм предотвращает преждевременную реакцию и повышает эффективность ПЦР.
- $MgCl_2$ (магния хлорид): Магний необходим для функционирования ДНК-полимеразы и взаимодействия с компонентами раствора. Концентрация $MgCl_2$ регулирует скорость и эффективность реакции.

- Деионизированная вода (ddH₂O): Чистая, свободная от примесей вода, необходимая для приготовления рабочего раствора реагентов.

Порядок использования

1. Подготовить рабочую смесь ПЦР, смешивая все компоненты набора согласно инструкции.
2. Добавить образец ДНК-матрицы и приготовить необходимое количество реакций.
3. Выполнить стандартные циклы ПЦР на соответствующем оборудовании.
4. Проанализировать полученный продукт реакции электрофорезом.

Список дополнительного оборудования:

- Встряхиватель Vortex
- Центрифуга для микропробирок
- Штатив для микропробирок
- Комплект дозаторов переменного объема
- Наконечники к микропробиркам
- Микропробирки на 1,5 или на 2,0 мл
- Микропробирки для ПЦР 0,2 мл

2.6 Экстракция ДНК из биологического материала

Подготовка к проведению реакции

После размораживания, реактивы встряхнуть в Vortex и центрифугировать.

Исследуемые образцы:

Наименование образца	Количество образца	Количество ПКО	Количество ОКО	Общее количество
Образцы кала здоровых лиц	27	1	2	30
Образцы кала пациентов с метаболическим синдромом	21	1	2	24
Образцы кала пациентов с колоректальным раком	7	1	2	10
Зубной камень	25	1	2	28
Грудное молоко	5	1	2	8

Объёмы компонентов в расчете на количество образцов:

Наименование	Объём на 1 образец/ мкл	Объём на 30 образцов /мкл	Объём на 28 образцов /мкл	Объём на 24 образцов /мкл	Объём на 10 образцов /мкл	Объём на 8 образцов /мкл
dd H ₂ O, деионизованная вода	1 4	42 0	39 2	33 6	14 0	11 2
dNTP дезоксинуклеозид фосфаты	2, 5	75	70	60	25	20
10X ПЦР буфер Б	2, 5	75	70	60	25	20
MgCl ²	2, 5	75	70	60	25	20
Forvard primer, прямой праймер	1	30	28	24	10	8
Revers primer, обратный праймер	1	30	28	24	10	8
SynTag ДНК-полимераза с ингибирующими активность фермента антителами	0, 5	15	14	12	5	4
ДНК образцы	1	по 1 мкл	по 1 мкл	по 1 мкл	по 1 мкл	по 1 мкл

Протокол работы

1. Приготовление реакционной смеси: Смешать компоненты ПЦР (кроме ДНК) в стерильных микропробирках на 1,5 мкл в следующем порядке:
 - Деионизованную воду (ddH₂O).
 - Раствор dNTP.
 - ПЦР буфер Б.
 - Хлорид магния (MgCl₂).
 - Forvard primer.
 - Revers primer.
 - SynTag ДНК-полимеразу.
2. Внесение ДНК: Аккуратно добавить равное количество ДНК-материала (1 μL) в каждую микропробирку, предварительно заполненную реакционной смесью.
3. Перемешивание: Перемешать содержимое микропробирок в Vortex

Настройка программного обеспечения для проведения ПЦР Установка программы термоциклира GeneExplorer, GE-96G

1. Инициализация:
 - Температура: 94°C
 - Время: 30 секунд

Этот цикл предназначен для начальной денатурации ДНК-матрицы и активации Таq-полимеразы.

2. Циклы амплификации (30 циклов):

- Денатурация:
 - Температура: 94°C
 - Время: 30 секунд

На этом этапе двойная спираль ДНК разделяется на две отдельные цепи.

- Отжиг:
 - Температура: 67°C
 - Время: 30 секунд

Праймеры присоединяются к комплементарным последовательностям одноцепочечных молекул ДНК.

- Удлинение:
 - Температура - 72°C
 - Время - 3 мин. 30 сек.

Фермент Таq-полимераза осуществляет сборку новых цепей ДНК, идеально дополняющих исходные матричные участки.

3. Финальное удлинение:

- Температура: 72°C

- Время: 10 минут

Этот цикл завершает синтез всех незавершенных цепей ДНК.

4. Хранение:

- Температура: 10°C
- Бесконечное время

2.7 Анализ продуктов ПЦР

Проверка качества выделенной ДНК. Электрофорез в 1% агарозном геле

1. Подготовка геля:

- Для приготовления геля агарозу растворяют в буферном растворе (1,6г. – агарозы + 98 мл. дистиллированной воды + 2 мл. (50Х) TAE-Buffer) и нагревают до полного растворения.
- Полученную смесь заливают в специальную форму с гребнем, чтобы создать лунки для загрузки образцов.
- После остывания и затвердевания геля гребень удаляют, оставляя лунки.

2. Загрузка образцов:

- Образцы ДНК смешивают с загрузочным красителем (бромфеноловый синий – 2 мкл., образцы ДНК – 5 мкл.) и с буферным раствором (TAE-Buffer (1Х)): 10 мл. (50Х) – TAE Buffer + 490 мл. дист.воды.

- Загрузочный краситель помогает отслеживать продвижение образцов в геле.
- Образцы загружаются в лунки геля с помощью микропипеток.

3. Создание электрического поля:

- Электроды подключаются к источнику постоянного тока. Один электрод (+) находится на одном конце геля, другой (-) — на другом.
- При включении тока создается электрическое поле, которое заставляет заряженные молекулы ДНК двигаться через гель.

4. Разделение молекул:

- Молекулы ДНК имеют отрицательный заряд из-за фосфатных групп в их структуре. Поэтому они перемещаются к положительному электроду (+).
- Скорость движения молекул зависит от их размера: мелкие молекулы проходят через поры геля быстрее, чем крупные.

5. Остановка процесса и визуализация:

- Когда разделение завершено, ток отключается.
- Для визуализации молекул в геле используют специальные красители, такие как бромистый этидий на 5 мин. Красители связываются с ДНК и светятся под ультрафиолетовым светом.

Интерпретация результатов с помощью Системы гель-документирования ChemiDoc MP

1. Подготовка геля:

После завершения гель-электрофореза гель извлекается из аппарата и помещается на платформу ChemiDoc MP.

2. Настройка камеры:

Выбрать режим съемки и настроить параметры экспозиции.

3. Захват изображения:

Камера делает снимок геля, используя выбранный источник света.

4. Анализ и обработка изображения:

Программное обеспечение Image Lab позволяет анализировать изображение, измерять интенсивность полос, сравнивать образцы и создавать отчеты.

2.8 Статистическая обработка данных

Значимость статистической обработки данных

Статистический анализ является важным инструментом исследования микробиоты человека и позволяет выявить закономерности распределения микроорганизмов среди разных групп населения. Анализ полученных результатов помогает оценить распространенность бактерий вида *Akkermansia muciniphila* в зависимости от типа исследуемого биоматериала и состояния здоровья обследуемых лиц.

Методология сбора и анализа данных

Исследование включало различные типы биологического материала. Полученные данные были подвергнуты качественному анализу с целью определения доли положительных образцов в каждой группе:

- Грудное молоко – 4 положительных образца из 5;
- Образцы кала у здоровых лиц – 17 положительных образцов из 27;
- Образцы кала пациентов с колоректальным раком – 4 положительных образца из 7;
- Образцы кала пациентов с метаболическим синдромом – 2 положительных образца из 21;
- Зубной камень – 7 положительных образцов из 25.

Характеристика собранных данных

Анализ показал следующие значения частоты выявления *Akkermansia muciniphila*:

Частота выявляемости (%):

- Грудное молоко – 80%
- Образцы кала у здоровых лиц – 63%
- Образцы кала пациентов с колоректальным раком – 57%
- Образцы кала пациентов с метаболическим синдромом – 10%
- Зубной камень – 28%

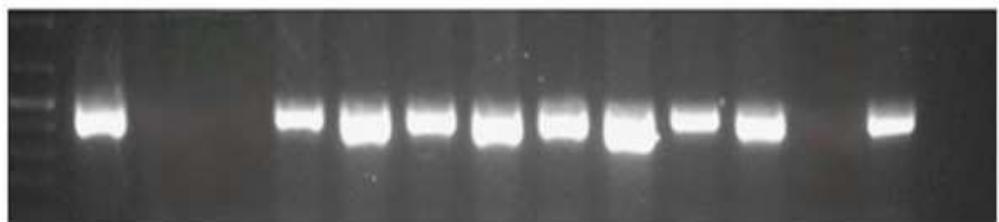
Глава III РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Результаты Гель-электрофореза

В ходе проведения электрофореза в 1% агарозном геле получены следующие результаты:



1. Результат ПКО пробиотической капсулы содержащая культуру *Akkermansia muciniphila*.



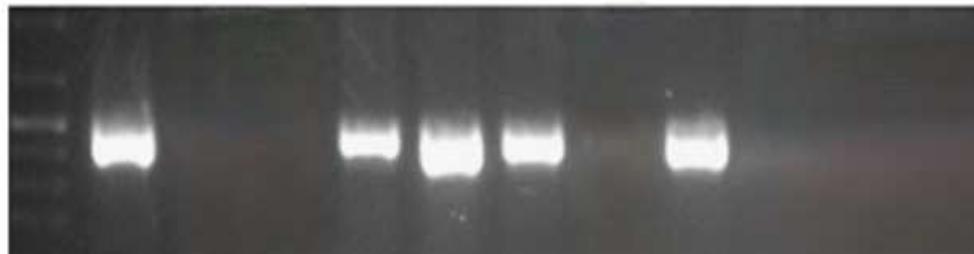
2. Результаты, полученные с образцов кала здоровых лиц



3. Результаты, полученные с образцов пациентов с метаболическим синдромом



4. Результаты, полученные с зубного камня



5. Результаты, полученные с образцов пациентов с колоректальным раком



6. Результаты, полученные с грудного молока

3.2 Сравнительный анализ полученных данных

- Высокая частота обнаружения *Akkermansia muciniphila* в грудном молоке (80%) свидетельствует о значительном присутствии данной бактерии в организме кормящих женщин. Это может иметь важное значение для формирования микрофлоры кишечника новорожденных детей, влияя на здоровье и развитие ребенка.
- Частое выявление бактерии в образцах кала здоровых лиц (63%) подтверждает её присутствие в нормальной кишечной флоре здорового организма. Однако снижение показателя у пациентов с колоректальным раком (57%) может указывать на изменение бактериального состава при развитии онкологических заболеваний толстой кишки.
- Особенно низкий процент выявления бактерии у пациентов с метаболическим синдромом (10%) подчеркивает потенциальную связь

между дефицитом *Akkermansia muciniphila* и развитием нарушений обмена веществ. Этот факт согласуется с ранее опубликованными результатами исследований, показывающих положительную роль бактерии в поддержании нормального метаболизма и предотвращении ожирения.

- Промежуточная величина обнаруживаемости (28%) в зубном камне может свидетельствовать о роли *Akkermansia muciniphila* в формировании микробиоценоза полости рта, однако эта область требует дальнейшего изучения.
- Полученные данные подтверждают важность статистического анализа в оценке присутствия специфических видов бактерий в микробиоте человека и позволяют установить взаимосвязь между составом микробиома и состоянием здоровья.



Эти данные позволяют сделать вывод о вариабельности распространения *Akkermansia muciniphila*, зависящей от состава изучаемой группы участников и типа биологического образца.

Заключение

- В ходе проведённого исследования были разработаны и опробованы олигонуклеотидные праймеры, предназначенные для идентификации бактерии *Akkermansia muciniphila* методом ПЦР. После предварительного анализа последовательностей ДНК с использованием международного банка данных EMBL/GenBank/DDBJ, были выбраны уникальные и высококонсервативные участки, что позволило обеспечить высокую специфичность и чувствительность тест-системы.
- Экспериментально доказано, что разработанная методика эффективно распознаёт *Akkermansia muciniphila* в различных типах биоматериала, демонстрируя отличные аналитические характеристики:
- Максимальная частота выявления (80%) зарегистрирована в грудном молоке, что подтверждает важную роль этой бактерии в становлении детской микробиоты.
- Средняя распространённость (63%) отмечена в образцах кала здоровых лиц, что показывает устойчивость и постоянство присутствия бактерии в нормальном состоянии кишечной флоры.
- Значительно пониженная частота выявления (10%) установлена у пациентов с метаболическим синдромом, что указывает на вероятную защитную роль бактерии против нарушений обмена веществ.

Промежуточный уровень выявленности (28%) обнаружен в зубном камне, свидетельствующий о возможной экстратрофической циркуляции бактерии в организме.

ВЫВОДЫ

1. Разработана и апробирована тест-система для идентификации *Akkermansia muciniphila* методом ПЦР. Использование высококонсервативных участков ДНК и оптимизированных праймеров обеспечило высокую специфичность и чувствительность метода, что подтверждено результатами гель-электрофореза и статистического анализа.

2. Разработка тест-системы на основе синтезированных праймеров подтвердила её высокие показатели чувствительности и специфичности. Методика успешно прошла тестирование на положительном и отрицательном контроле, подтвердив способность точно идентифицировать целевой микроорганизм.

3. Исследование выявило значительные различия в частоте обнаружения *Akkermansia muciniphila* в зависимости от типа биоматериала. Наибольшая распространённость (80%) отмечена в грудном молоке, что подчёркивает её потенциальную роль в формировании микробиоты младенцев. В то же время у пациентов с метаболическим синдромом бактерия была обнаружена лишь в 10% случаев, что указывает на её возможную связь с метаболическими нарушениями

4. Разработанная тест-система может быть внедрена в клиническую и лабораторную практику для мониторинга состояния микробиоты у пациентов с различными заболеваниями. Это позволит улучшить диагностику, оценивать эффективность терапии и разрабатывать персонализированные рекомендации, например, в области гастроэнтерологии и диетологии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авраменко И.К., Соловьева Н.В., Яковлева Н.В., Савостьянов К.В., Сергеева А.А., Шилова С.А. Анализ состава микробиоты кишечника методами высокопроизводительного секвенирования // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2018, № 5, стр. 46–51.
2. Белозерова Н.Н., Семенов А.С., Семенова А.А. Особенности изменений микробиоты кишечника при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // Кардиология 2019, № 5, стр. 3–8.
3. Григорьев П.Я., Яковлев В.Н. Инфекции, передающиеся контактным путем. Москва: Медицина, 2016.

4. Гудков А.В., Николаев С.А., Данилов Р.Б. Руководство по микробиологическим методам исследования. Москва: ТриадаХ, 2017.
5. Ершов Ф.И., Блинова Н.Г., Борисова Е.С., Зайцева М.П., Морозова И.Ю., Чирков С.М., Ярилин А.А. Полимеразная цепная реакция в диагностике инфекций и молекулярно-биологической практике // Лаборатория Будущего 2016, № 3, стр. 10–16.
6. Зайчик Р.К., Герасимчук С.В., Васильева Л.И. Особенности функционирования *Akkermansia muciniphila* и перспективы использования её в профилактике хронических заболеваний // Microbial Ecology. 2024.
7. Козлов Р.С., Гордеев В.Д., Малышев Н.А., Новик Г.Н., Стрелецкая К.А., Червонцева Л.Е. Современные технологии генетической диагностики и скрининга наследственных заболеваний // Вопросы медицинской химии 2015, Том 61, № 3, стр. 155–163.
8. Лебедева Н.Н., Корнева Ю.А., Абрамова А.В. Оценка эффективности методов выделения ДНК из фекальных образцов для определения микробиоценоза кишечника // Труды конференции молодых ученых МГУ имени М.В. Ломоносова 2018.
9. Логинова Н.А., Кошелева Н.В., Симонова Г.Ф., Попов А.Л., Красноперов В.В. Микробиота кишечника и её значение в регуляции физиологических функций организма // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии 2019, Том 29, № 1, стр. 36–43.
10. Марьясис Е.Д. Основы клинической биохимии и микробиологии. Москва : МедПресс-информ, 2019.
11. Никитин С.А., Перегудова Е.В., Скрипкин Ю.К. Значимость грамотрицательной анаэробной палочки *Akkermansia muciniphila* в

поддержании гомеостаза слизистой оболочки кишечника // Вестник новых медицинских технологий 2018, Том XXV, № 4, стр. 31–36.

12. Постановление Правительства РФ от 27 декабря 2012 г. № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».

13. Приказ Минздрава России от 13 октября 2017 г. № 804н «Об утверждении номенклатуры медицинских услуг».

14. Румянцев А.Г., Афанасьев С.С., Григорян Г.А. Иммунитет и инфекционные заболевания. СПб.: Издательство Политехнического университета, 2018.

15. Смирнова Н.А., Петрова Е.О., Серебрянников В.В. Генетика и микробиота человека в свете современных исследований // Человек и лекарство 2017, № 3, стр. 14–19.

16. Сыромятников М.Ю., Гладких М.И., Нестерова Е.Ю., Попов В.В. Разработка TaqMan ПЦР-метода для идентификации пробиотического агента нового поколения *Akkermansia muciniphila* // Биотехнология. 2025.

17. Тимакова Э.Э., Куценко Д.В., Исаченко Е.А., Колесникова О.В., Орлова Ю.Б., Решетов И.В. Современное состояние изучения микробиоты человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2018, № 3, стр. 31–39.

18. Федеральный закон Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

19. Чернышёва Н.В., Бычкова А.В., Дмитриева А.А. Молекулярные методы в изучении микроорганизмов: проблемы и перспективы // Молекулярная биология 2016, Том 50, № 6, стр. 1014–1022.

20. Щербаков Ю.И., Воронин В.В., Ивашкевич В.В. Проблемы стандартизации лабораторных методик в биотехнологии и медицине //

Сборник докладов Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология и медицина XXI века» 2017.

21. Юлия Лукасюк. Перспективы использования *Akkermansia muciniphila* в лечении заболеваний пищеварительной системы // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и проктологии. 2024.

22. Ян Хао, Лю Йонгъян, Ван Си, Донг Сянь и другие. Роль *Akkermansia muciniphila* в поддержании гомеостаза метаболизма и прогрессировании заболеваний: влияние оси кишечник-печень-мозг // International Journal of Molecular Sciences. 2023.

23. Derrien M., Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM. The Intestinal Microbiota in Health and Disease: From Correlation to Causation // Nature Reviews Microbiology 2018, Vol. 16, pp. 623–638.

24. Everard A., Belzer C., Geurts L., Ouwerkerk JP, Druart C., Bindels LB, Guiot Y., Derrien M., Muccioli GG, Delzenne NM, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity // Proceedings of the National Academy of Sciences USA 2013, Vol. 110, No. 22, pp. 9066–9071.

25. Le Chatelier E., Nielsen T., Qin J., Prifti E., Hildebrand F., Falony G., Almeida M., Arumugam M., Batto JM., Kennedy S., Leonard P., Li J., Burgdorf KS., Grarup N., Jørgensen T., Brandslund I., Nielsen HB., Juncker AS., Bertalan M., Levenez F., Pons N., Rasmussen S., Sunagawa S., Tap J., Tims S., Zoetendal EG., Brunak S., Clément K., Doré J., Kleerebezem M., Kristiansen K., Renault P., Sicheritz-Pontén T., Raes J., Hansen T., MetaHIT Consortium, Pedersen O. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers // Nature 2013, Vol. 500, No. 7464, pp. 541–546.

26. Turroni F., van Sinderen D., Ventura M. Genomic insights into bifidobacterium biology: Lessons learned from next-generation sequencing technologies // Current Opinion in Biotechnology 2014, Vol. 29, pp. 146–153.
27. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Folsch UR, Timmis KN, Schreiber S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease // Gut 2004, Vol. 53, No. 5, pp. 685–693.
28. Miao Y., Wang M., Sun H., Zhang Y., Zhou W., Yang W., et al. Akkermansia muciniphila Ameliorates Colonic Injury in Mice with DSS-Induced Acute Colitis by Blocking Macrophage Pro-Inflammatory Phenotype Switching via the HDAC5/DAB2 Axis // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2024.
29. Jian H., Liu Y., Wang X., Dong X., Zou X. Akkermansia muciniphila as a Next-Generation Probiotic in Modulating Human Metabolic Homeostasis and Disease Progression // Int. J. Mol. Sci. 2023.

ОТЗЫВ РЕЦЕНЗЕНТА О ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЕ

обучающегося **Мингалиевой Элизы Фанисовны** группы БМ-201
по теме: «Разработка тест-системы для идентификации *Akkermansia muciniphila* методом
ПЦР».

Целью данной работы являлось приобретение навыков по сбору и обработке биологической информации, умений обобщать результаты исследования в конкретные выводы и предложения, проявление творческого подхода к решению проблемы, подготовка к самостоятельной работе по специальности. Тема и содержание выпускной квалификационной работы соответствуют положениям федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.04.01. Биология (магистратура). Работа заслуживает положительной оценки, так как решены все поставленные задачи. При выполнении выпускной квалификационной работы были освоены методы группировки, сравнения и др. Работа выполнена на должном научном уровне, тема раскрыта достаточно полно, сделаны выводы. При написании обзора литературы по теме выпускной квалификационной работы были освоены навыки реферирования литературных данных, их обобщения и анализа. Обзор литературы написан профессионально грамотно, так как автором учтены требования действующих нормативных и правовых актов, использованы материалы, опубликованные за последние пять лет. Экспериментальная часть содержит результаты самостоятельных исследований по изучаемой теме, которая являлась базой производственной практики обучающихся. Для решения поставленных задач обучающимся была проявлена личная творческая инициатива в сборе информации, выполнены расчеты, произведен анализ результатов исследований и сделаны выводы. Выводы отражают основные результаты проведенных исследований. Работа проиллюстрирована таблицами и рисунками, оформлена аккуратно, практически отсутствуют ошибки, материал изложен четко и грамотно. Результаты проведенной работы имеют практическую значимость. На основании вышеизложенного считаю, что работа может быть допущена к защите на присвоение квалификации магистр по направлению подготовки 06.04.01. Биология.

Рецензент:
к.б.н., доцент кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

Дата 16.06.2025



ОТЗЫВ РЕЦЕНЗЕНТА о выпускной квалификационной работе

обучающегося Мингалиевой Элизы Фанисовны группы БМ-201
по теме: «Разработка тест-системы для идентификации *Akkermansia muciniphila*
методом ПЦР».

Целью данной работы являлось приобретение навыков по сбору и обработке биологической информации, умений обобщать результаты исследования в конкретные выводы и предложения, проявление творческого подхода к решению проблемы, подготовка к самостоятельной работе по специальности. Тема и содержание выпускной квалификационной работы соответствуют положениям федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.04.01. Биология (магистратура). Работа заслуживает положительной оценки, так как решены все поставленные задачи. При выполнении выпускной квалификационной работы были освоены методы группировки, сравнения и др. Работа выполнена на должном научном уровне, тема раскрыта достаточно полно, сделаны выводы. При написании обзора литературы по теме выпускной квалификационной работы были освоены навыки реферирования литературных данных, их обобщения и анализа. Обзор литературы написан профессионально грамотно, так как автором учтены требования действующих нормативных и правовых актов, использованы материалы, опубликованные за последние пять лет. Экспериментальная часть содержит результаты самостоятельных исследований по изучаемой теме, которая являлась базой производственной практики обучающихся. Для решения поставленных задач обучающимся была проявлена личная творческая инициатива в сборе информации, выполнены расчеты, произведен анализ результатов исследований и сделаны выводы. Выводы отражают основные результаты проведенных исследований. Работа проиллюстрирована таблицами и рисунками, оформлена аккуратно, практически отсутствуют ошибки, материал изложен четко и грамотно. Результаты проведенной работы имеют практическую значимость. На основании вышеизложенного считаю, что работа может быть допущена к защите на присвоение квалификации магистр по направлению подготовки 06.04.01. Биология.

Рецензент:

научный сотрудник

лаборатории биоинженерии
и микроорганизмов Института
генетики УФИЦ РАН, к.б.н.

Дата 19.06.25



Лавина Анна Михайловна

Полінськ Лавченко А. В.
Заверяє спереда Аг Т. Адміністратор

ОТЗЫВ РУКОВОДИТЕЛЯ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

обучающегося **Мингалиевой Элизы Фанисовны** группы БМ-201
по теме: «Разработка тест-системы для идентификации *Akkermansia muciniphila* методом
ПЦР».

Обучающийся Мингалиевой Элизы Фанисовны успешно закончила курс обучения по направлению подготовки 06.04.01. Биология (магистратура). Итогом обучения явилось выполнение выпускной квалификационной работы, которая является исследовательской работой обучающегося.

При написании обзора литературы по теме выпускной квалификационной работы были освоены навыки реферирования и анализа данных источников литературы, а также обобщения полученной информации. В процессе выполнения экспериментальной части были проведены самостоятельные исследования, освоены методы группировки, сравнения и другие. Тема раскрыта полно, выводы отражают основные результаты исследования и могут быть использованы в практической деятельности.

В период выполнения выпускной квалификационной работы обучающийся показала себя трудолюбивым, добросовестным исследователем, проявила самостоятельность и творческую инициативу.

Работа отвечает требованиям, предъявляемым к выпускным квалификационным работам, аккуратно оформлена и может быть рекомендована к защите на присвоение квалификации магистр по направлению подготовки 06.04.01. Биология (магистр).

Научный руководитель:
к.м.н., заведующий кафедрой
фундаментальной и
прикладной микробиологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

Илья
Гимранова И.А.
(подпись)



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
"БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Автор работы: Мингалиева Э. Ф.

Самоцитирование

рассчитано для: Мингалиева Э. Ф.

Название работы: РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ AKKERMANCIA MACINIPHILA МЕТОДОМ ПЦР

Тип работы: Выпускная квалификационная работа

Подразделение: ФГБОУ ВО БГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

СОВПАДЕНИЯ	0.84%	СОВПАДЕНИЯ	0.84%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	98.65%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	99.04%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.51%	ЦИТИРОВАНИЯ	0.12%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 23.06.2025

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 23.06.2025 15:02

Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с.3, 5-49, титульный лист с.1, содержание с.2, введение с.3-5, выводы с.49-51

Модули поиска: Интернет Плюс; Перефразирования по коллекции IEEE; Цитирование; ИПС Адилет; Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Диссертации НББ; Рувики; Коллекция НБУ; Переводные заимствования; Шаблонные фразы; Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика; Патенты СССР, РФ, СНГ; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; IEEE; Переводные заимствования IEEE; Публикации РГБ; Публикации РГБ (переводы и перефразирования); Медицина; Публикации eLIBRARY; СМИ России и СНГ; Кольцо вузов; СПС ГАРАНТ: аналитика; Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования); Кольцо вузов (переводы и перефразирования); Перефразированные заимствования...

Работу проверил: Банникова Ольга Сергеевна

ФИО проверяющего

Дата подписи: 23.06.2025

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

Подпись проверяющего



Чтобы убедиться
в подлинности справки, используйте QR-код,
который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.