

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Медико-профилактический факультет с отделением микробиологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии**

Кенджиева Алия Абдулжалиловна

**ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ, ИМЕЮЩИХ
ПРИКЛАДНОЕ ЗНАЧЕНИЕ, ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ
СЕЛЕКЦИИ КУЛЬТУР С ПОЛЕЗНЫМИ ПРИЗНАКАМИ**

Руководитель:

профессор, д.м.н.

А. Р. Мавзютов

Уфа – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1. Фенотипические методы типирования штаммов.....	8
1.2. Методы генотипирования.....	10
1.3. Пробиотики.....	22
1.4. Лакто- и бифидобактерии.....	23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	28
2.1. Выделение препаратов ДНК микроорганизмов из клинического материала методом нуклеосорбции.....	28
2.2. Выделение препаратов ДНК микроорганизмов из клинического материала методом с использованием смолы Chelex.....	31
2.3. Выделение препаратов ДНК микроорганизмом фенол-хлороформным методом.....	32
2.4. Подбор праймеров.....	33
2.5. RAPD-анализ.....	34
2.6. Электрофорез.....	36
2.7. Компьютерный анализ.....	37
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	38
ВЫВОДЫ.....	47
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	48
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	55

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

НК - нуклеиновая кислота

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК - рибонуклеиновая кислота

рРНК - рибосомная рибонуклеиновая кислота

dNTP - дезоксирибонуклеотидтрифосфаты

MST - Multispacer Sequence Typing

RAPD - random amplified polimorphic DNA

RFEL - Restriction Fragment End Labelling

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

Дифференциация штаммов и видов микроорганизмов – актуальная задача микробиологии и эпидемиологии. Методы идентификации бактерий, основанные на фенотипических признаках, ПЦР, фрагмент-анализе в большинстве случаев не характеризуются высоким значением коэффициента дифференциации, воспроизводимостью, требуют применения в каждом эксперименте референсных штаммов. Генотипирование на основе секвенирования фрагментов генома микроорганизмов свободно от указанных недостатков, что открывает более широкие возможности в идентификации штаммов.

В последние годы среди используемых методов типирования главенствующее место стали занимать молекулярно-биологические подходы.

Видами внутривидового типирования являются биотипирование, фаготипирование, резистотипирование, серотипирование и генотипирование.

Биотипирование основывается на том, что для микроорганизмов характерна определенная вариабельность в ферментации отдельных углеводов, многоатомных спиртов, определенных аминокислот и др.

Фаготипирование – это методика определения источников заражения при мониторинге окружающей среды. Суть ее заключается в маркировке инфекционных штаммов бактерий при помощи бактериофагов. Другими словами, фаготипирование необходимо для идентификации штаммов бактерий, вызвавших тот или иной всплеск инфекционных заболеваний.

Этот метод используется для внутривидовой идентификации штаммов бактерий (для определения фаготипа бактерии – фаговара). Когда человек подвергается инфицированию определенной бактерией, которую высеяли при проведении бактериологических исследований, чтобы назначить эффективное лечение, необходимо знать, конкретно который из штаммов этой бактерии (ее разновидность) присутствует в организме человека. Например, существует много разновидностей стафилококка, к которым трудно подобрать антибиотик, не зная точно их фаготипа. Таким же разнообразием фаговаров «страдают» и бактерии рода *Shigella flexneri*, *Salmonella*, энтеропатогенная *Escherichia coli* и множество других бактерий.

Фаготипирование используют в случаях назначения лечения бактериофагами для эффективности их применения. Бактериологический анализ выявляет присутствие в организме конкретного вида бактерии, а с помощью фаготипирования определяют, подходит ли выбранный для лечения препарат бактериофага к данному бактериальному штамму, будет ли осуществлен лизис патогенной бактерии.

В качестве одного из методов фенотипического маркирования может использоваться и чувствительность к антибиотикам. В этом случае своеобразным маркером может служить спектр антибиотиков, к действию которых устойчив изучаемый штамм. Обычно у эпидемиологически связанных штаммов спектры резистентности оказываются идентичными. Следует помнить, что в отдельных случаях такие штаммы могут отличаться по 1-2 антибиотикам, входящим в спектр резистентности. Широкое распространение множественной лекарственной устойчивости, связанной с наличием определенных R-плазмид (утрата или приобретение), может определять некоторые отличия спектров резистентности у эпидемиологически родственных штаммов.

Метод серотипирования бактерий при исследовании микробной взвеси или обогащенного бульона основан на визуальном определении наличия агглютинации, цвет которой соответствует конкретной серологической группе бактерий. В бактериологических лабораториях наиболее широкое применение получили два метода: классический метод пробирочной реакции агглютинации и метод иммобилизации в полужидком агаре. Первый из них сопряжен с необходимостью многократного пассирования исследуемых штаммов и потому длителен во времени – занимает до недели и более, а важнейшим недостатком второго является большой расход диагностических препаратов и трудоемкость приготовления в стерильных условиях полужидкого агара с сыворотками и розлива его в большое количество пробирок. Рекомендуемый способ серотипирования посредством реакции агглютинации на стекле является простым, легко доступным для выполнения в бактериологических лабораториях любой категории, обеспечивает, по сравнению с классическим, значительное сокращение срока получения результата, а по сравнению с методом иммобилизации в полужидком агаре – 10-15-кратную экономию диагностических сывороток.

Генотипирование микроорганизмов – основное методическое направление современной молекулярной эпидемиологии. Существуют методы: полного и лимитированного секвенса генов, анализ полиморфизма длин фрагментов рестрикции ДНК, сполиготипирование, VNTR-типирование, резистотипирование и др.

Целью работы явилась сравнительная оценка информативности нескольких методов генотипирования для дифференцирования лакто- и бифидобактерий.

Задачи исследования:

1. Подобрать видоспецифичные праймеры к консервативным генам видов лакто- и бифидобактерий для их внутривидового дифференцирования.
2. Оценить специфичность подобранных праймеров на контрольных образцах.
3. Оценить возможность применения методов молекулярного фингерпринтирования для выявления генетических различий между штаммами пробиотических микроорганизмов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Фенотипические методы типирования штаммов

Исторически первоначально для типирования бактерий использовались фенотипические методы, основанные на выявлении таких свойств, как способность к утилизации отдельных субстратов (биохимическое типирование), наличие общих антигенных детерминант (серотипирование), чувствительность к бактериофагам (фаготипирование), а также к антибактериальным препаратам (типирование по антибиограмме).

Однако для фенотипических методов характерен ряд недостатков, которые ограничивают их применение. Важнейшим из них является невозможность оценивать эволюционные связи и структуру бактериальных популяций. Фенотипические методы отличаются значительной трудоемкостью и недостаточной воспроизводимостью. Они, как правило, являются уникальными и предназначены для типирования бактерий в пределах конкретных биологических видов. Например, методологию фаготипирования стафилококков невозможно применить для типирования кишечной палочки. Важным моментом является то, что фенотип далеко не всегда соответствует определенному генотипу. Одинаковым спектром резистентности к антибактериальным препаратам могут обладать не только разные штаммы одного и того же вида, но и представители разных видов [С.В. Сидоренко, 2010].

Из фенотипических признаков для типирования бактерий можно использовать самые простые, такие как морфология и цвет колоний, но их разрешающая способность, как правило, незначительна. Так, на практике достаточно часто применяют типирование *Staphylococcus* spp. и *Escherichia coli* по признаку образования гемолиза на плотных питательных средах, содержащих кровь. Наиболее распространенным методом является

биотипирование, предполагающее оценку биохимической активности бактерий. Так, этот метод с успехом применяется для типирования *Acinetobacter* spp. [Bouvet P. J., 1987] и некоторых других бактерий.

В биотипировании используются картины метаболической активности и морфология колоний. Выделенные штаммы называют биотипами. Методами биотипирования, например, могут являться реакции гемагглютинации и гемолиза. Преимущества биотипирования:

- большинство штаммов поддается типированию;
- легкость в работе и интерпретации.

Недостаток: нестабильность признаков, по которым ведется дифференциация [Prakash S. Bisen, 2012]

Еще одним важным фенотипическим методом является серотипирование. Этот метод незаменим при типировании сальмонелл. В то же время для ряда бактерий классический вариант серотипирования с применением специфических антисывороток вытесняется молекулярными методами анализа генов, кодирующих соответствующие антигены [Owen R. J., 1995; Stanley J., 1995]. Широко распространенные в свое время методы фаготипирования и бактериоцинотипирования к настоящему времени во многом утратили свое значение из-за недостаточной разрешающей способности, под которой подразумевают способность метода оценивать как отдельные типы, так и два штамма, случайно отобранные из бактериальной популяции. Для количественной оценки дискриминирующей способности методов типирования применяют индекс разнообразия Симпсона (D) [Gaston M. A., 1989; Hunter P. R., Gaston M. A., 1988].

Очень высокой разрешающей способностью обладают методы, основанные на электрофоретическом исследовании компонентов

микробной клетки (белков и липополисахаридов), однако они отличаются сложностью и трудоемкостью в выполнении. Один из вариантов таких методов — мультилокусный электрофорез ферментов (multilocus enzyme electrophoresis — MLEE). Этот метод послужил основой для разработки генотипического метода мультилокусного секвенирования [Selander R. K., 1986].

Метод фаготипирования используется, чтобы проследить источник вспышки инфекций. Вирусы, которые заражают бактерии, называются бактериофаги, и некоторые из них могут заразить только один штамм бактерии. Эти фаги используются для идентификации различных штаммов бактерий в пределах одного вида [Baggesen DL, 2010].

Недостатком данного метода является то, что требуется поддержание биологически активных фагов. Многие штаммы не типизируются.

1.2. Методы генотипирования

1.2.1. Фингерпринтинг-анализ

Фингерпринтинг метод анализа первичной структуры белков или нуклеиновых кислот с целью их идентификации, основан в составлении с помощью хроматографии карты пептидов, образующихся после частичного гидролиза белка, или карты разделенных с помощью электрофореза фрагментов, которые образуются после рестрикции ДНК.

Метод «Фингерпринтинг» применяют для оценки общей степени сходства, и представляет собой общий срез класса соединений, содержащихся в клетке, без идентификации отдельных компонентов.

Фингерпринтинг может применяться для идентификации штаммов и видов бактерий.

ПЦР-фингерпринтинг — это геномная дактилоскопия с использованием полимеразной цепной реакции для наработки нужного количества исследуемой бактериальной ДНК.

В современной микробиологии при идентификации бактерий и определении их филогенетических отношений часто применяются различные молекулярно-биологические методы. Одним из общепринятых подходов является анализ сходства первичной структуры нуклеотидных последовательностей рРНК. Этот метод позволяет с высокой степенью правильно оценить филогенетическое положение прокариот на родовом и выше уровнях. Однако консервативность нуклеотидной последовательности рРНК ограничивает использование данного метода для диагностики близкородственных бактерий. Для более точной идентификации бактерий наиболее часто применяют анализ нуклеотидных последовательностей межгенной области – 23S рРНК. Но и данный метод не всегда дает достоверные результаты, особенно при анализе близких видов и штаммов. Кроме того, приведенные методы являются достаточно трудоемкими и дорогостоящими. Такого же рода анализ, помимо гена рРНК и межгенной области 16S-23S рРНК, проводится и для других генов прокариот.

На сегодняшний день активное развитие получил класс методов геномного фингерпринтинга. Основанный на интегральных способах сравнения геномов изучаемых организмов. Эти методы не требуют знания полной молекулярной организации генома и намного дешевле, чем методы сравнения нуклеотидных последовательностей отдельных генов.

Различные варианты фингерпринтинга основаны на изучении геномной ДНК бактерий для идентификации индивидуальных особенностей штаммов, которые могут быть применены при создании штамм-специфичных паспортов. AmpFLP или усиленный полиморфизм длины фрагмента были также осуществлены в начале 1990-х. Эта техника

была быстрее, чем анализ RFLP и использовала PCR, чтобы усилить образцы ДНК [Willems A., 2000; Paun O., Schönswetter P., 2012].

Эффективность этих методов в наибольшей степени зависит от выбора систем олигонуклеотидных праймеров. Они изучают полиморфизм определенной, сравнительно малой части генома, что крайне уменьшает разрешающую способность методики, не позволяя разделять близкородственные виды и штаммы. При клинической диагностике и эпидемиологических исследованиях, в сельском хозяйстве при определении этиологии возбудителей, а также при патентовании промышленных штаммов и создании молекулярных паспортов необходимо правильно различать и идентифицировать близкородственные штаммы. Поэтому большой интерес представляет разработка методов, позволяющих определять такие различия и поиск новых праймерных систем, дающих более высокую разрешающую способность метода.

1.2.2. RAPD-анализ

К методам типирования на основе ПЦР, в которых амплифицируются повторяющиеся последовательности, относится RAPD-ПЦР.

Метод RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA, ПЦР анализ на основе амплификации случайных фрагментов ДНК) позволяет определить полиморфность амплифицированных ПЦР-фрагментов. Данный метод основан на использовании коротких произвольных олигонуклеотидных праймеров длиной 9-10 н.п. (содержащие более 50% GC), которые гибридизуются с ДНК-мишенью при низкой температуре отжига.

Однако можно использовать и более длинные праймеры, но при этом температура их отжига должна быть значительно ниже оптимальной. Также праймер должен иметь неспецифическую последовательность,

благодаря чему он связывается с множеством комплементарных участков в ДНК и, в случае их близкого расположения друг к другу, амплифицирует их. Для увеличения количества комбинаций ПЦР можно использовать не отдельные праймеры, а комбинировать их в пары. «Двупраймерный» RAPD дает больше мелких фрагментов, чем стандартная методика; при этом больше половины синтезированных продуктов отличаются от «однопраймерного» RAPD [Welsh J., 1991; Hu J., 1995].

Многие исследователи применяют этот метод для дифференциации штаммов бактерий [Berthier F, 1999].

В отличие от большинства традиционных ПЦР маркеров, RAPD не требует знания специфических последовательностей генетических локусов. В связи с этим метод, в основном, используется для изучения полиморфизма у тех организмов, где гены не секвенированы, и последовательности ДНК неизвестны. Маркеры, используемые в RAPD анализе практически все доминантные, и поэтому с их помощью невозможно отличить гомозиготы и гетерозиготы. Очень редко встречаются информативные для генетического анализа кодоминантные маркеры. Для RAPD-анализа важна высокая концентрация и хорошее качество исходной геномной ДНК: метод требует длинных фрагментов ДНК в качестве матрицы и не может использоваться в тех случаях, когда ДНК подвергалась деградации. [Шагинян И.А., Гинцбург А.Л., 1995]

Метод характеризуется невысокой воспроизводимостью, и результаты опытов трудно интерпретировать. Разные наборы RAPD праймеров отличаются по степени специфичности, а полученные с их помощью данные могут интерпретироваться по-разному.

Образующиеся ПЦР-продукты являются генотип-специфичными и могут быть легко разделены в агарозном геле. Этот метод

нерадиоактивный, требует нанограммы ДНК, и применим к широкому спектру видов.

Если сравнивать RAPD-PCR с другими молекулярно-генетическими методами то он имеет ряд преимуществ, таких как:

- относительная простота и быстрота анализа (несколько часов),
- относительная дешевизна метода в реактивах и оборудовании.

Одним из главных плюсов RAPD-PCR-анализа является то, что предлагаемый способ анализа генетической изменчивости ДНК основана на использовании одного короткого олигонуклеотидного праймера с произвольной последовательностью.

Случайные праймеры (праймеры с произвольной последовательностью) или праймеры, комплементарные повторяющимся участкам, – это короткие праймеры, связывающиеся с большим количеством участков бактериального генома. Для синтеза таких праймеров нет необходимости в знании конкретных нуклеотидных последовательностей генома исследуемой бактерии. Такие праймеры с произвольной последовательностью должны лишь отвечать определенным требованиям по соотношению GC состава (50-60%) и длине оснований (8-15) [Arbeit R.D., 1994].

Метод основан на амплификации фрагментов ДНК с использованием одиночного короткого праймера с низкой температурой отжига в реакции PCR.

Праймер взаимодействует с ДНК бактерий в двух различных участках инвертированных повторов. При электрофоретическом разделении амплифицированных продуктов образуются дискретные продукты, размер которых варьирует от 100 до 5000 п.н. (ДНК-спектры). Эти участки представляют собой анонимную, как правило, уникальную

последовательность ДНК, заключенную между двумя инвертированными повторами. Различия в ДНК-спектрах определяются в одном или обоих праймер-связывающих сайтах (наличие или отсутствие полосы ПЦР-продукта в спектре) или присутствием инсерции/делеции в амплифицируемом фрагменте (различия ПЦР-продуктов по размеру).

RAPD-PCR-анализ может служить своеобразным экспресс методом выявления генетического полиморфизма [Caetano-Anolles G., 1991].

1.2.3. AFLP-анализ

В настоящее время наиболее популярен быстрый и высоко воспроизводимый метод AFLP-анализа (amplified fragment length polymorphism), дающий возможность одновременно анализировать большое число (500-300) полиморфных локусов преимущественно селективно-нейтральной природы, представленных уникальными и умеренно повторяющимися последовательностями [Vos P., 1995]. AFLP широко используется для анализа популяционного полиморфизма, филогенетических отношений, идентификации видов, маркирования локусов, сцепленных с хозяйственно ценными признаками [Renganayaki K., 2001; Soleimani V.D., 2002; Kim P., 2010]. В селекции метод подходит для предварительной оценки генетического пула с целью планирования стратегии скрещиваний, подбора комбинаций генотипов, а также для проведения отбора [Sensi E., 2003; Portis E., 2004]. AFLP-подход хорошо зарекомендовал себя при исследованиях генетического полиморфизма у разных объектов, в том числе у культивируемых видов растений [Wang F., 2011; Tumbilen Y., 2011; Akkale C., 2010].

Преимущества метода:

- полиморфизм выше, чем у RAPD,
- неограниченное количество образцов в каждом анализе

Недостатками метода являются сравнительно дорогое оборудование, программное обеспечение, а также дорогие расходные материалы.

1.2.4. RFEL-анализ

Метод RFEL в полной мере удовлетворяет всем предъявляемым требованиям, обеспечивая формирование уникальных генетических штрих-кодов, являющихся графическим аналогом обычных штрих-кодов.

Предложенный метод идентификации микроорганизмов путем концевой мечености рестриктазных фрагментов ДНК (RFEL) [Van Bergen P., 1995] весьма прост по исполнению и при этом очень информативен. Его главное отличие от применявшихся очень давно и поэтому почти забытых (для целей геносистематики) подходов по электрофоретическому разделению рестриктазных фрагментов ДНК каких-либо организмов заключается в использовании полиакриламидного геля с денатурирующим агентом в виде мочевины, что позволяет разделять одноцепочечные фрагменты ДНК и определять их истинные размеры с высокой или, по сути, с максимально возможной для этой цели точностью (с точностью до одного нуклеотида). Кроме точного определения размеров рестриктазных фрагментов ДНК, данный подход направлен и на уменьшение числа анализируемых фрагментов. Поскольку в 6%-ном полиакриламидном геле возможно эффективное разделение только относительно коротких фрагментов ДНК, то использование для расщепления ДНК гексануклеотидных рестрикционных эндонуклеаз (со средними размерами получаемых фрагментов около 4 т.п.н.) приводит к заметному сокращению числа видимых на геле полос ДНК и вместо нескольких сотен или даже тысяч сливающихся между собой в агарозном геле рестриктазных фрагментов ДНК экспериментатор имеет дело всего лишь с полусотней-сотней, имеющих размеры, пригодные для разделения в таком полиакриламидном геле. Именно это сочетание используемой для расщепления ДНК гексануклеотидной рестрикционной эндонуклеазы

вкупе с использованием для электрофоретического разделения рестриктазных фрагментов в их одноцепочечном состоянии с точностью до нуклеотида полиакриламидного геля, содержащего денатурирующий агент, и определяет уникальные возможности данного метода [Olive D.M., P.Bean, 1999].

Следует отметить, что методы RFEL (КМРФ) и AFLP имеют много общего. Так, их первый и последний этапы в виде рестриктазного расщепления и электрофоретического разделения продуктов реакции практически полностью совпадают. Главные же отличия заключаются в необходимости в методе AFLP введения дополнительных стадий по лигированию рестриктазных фрагментов ДНК со специальными адаптерами и проведению ПЦР. Также довольно прост по исполнению и отчасти похож на RFEL метод, получивший название «таксонопринт» [Федоров А.Н., 1992]. Однако основное отличие этих методов заключается в особенностях электрофоретического разделения рестриктазных фрагментов ДНК, в результате которого «таксонопринт» обеспечивает выявление характерных повторяющихся элементов генома, типичных именно для таксонов разного ранга, начиная с видового и выше, и не предназначен для паспортизации штаммов бактерий. В литературе имеется ряд публикаций, описывающих разработку компьютерных программ, позволяющих проводить рестриктазное расщепление бактериальной ДНК *in silico* (если, конечно, геномы анализируемых штаммов полностью секвенированы), что дает определенные предварительные знания для использования, например генотипирования штаммов бактерий с помощью AFLP, SRF, RFEL и некоторых других подходов [Bikandi J., 2004].

С учетом дешевеющих способов секвенирования ДНК, включая полногеномное секвенирование, появились подходы к генотипированию некоторых бактерий на основе особенностей нуклеотидных последовательностей отдельных генов или обладающих большей

вариабельностью спейсерных участков. Так, еще в 1998 г. был предложен метод генотипирования бактерий *Neisseria meningitides* с помощью так называемого многолокусного типирования (нуклеотидных) последовательностей – MLST (MultiLocus Sequence Typing) некоторых генов [Maiden et al., 1998], при этом авторы отметили трудность межлабораторного сравнения штаммов существующими методами, тогда как предложенный ими подход позволил оперировать однозначными данными по нуклеотидным последовательностям, поддающимися определенной оцифровке. Однако такой подход можно считать ограниченно годным, поскольку для каждого вида бактерий требуются собственные базы данных, которые пока составлены лишь для некоторых весьма патогенных видов [Enright M.C., 1999; Urwin R., Maiden M.C., 2003].

Аналогичная ситуация имеет место и для другого метода – MST – Multispacer Sequence Typing, рассчитанного на использование полиморфных вариантов спейсерных последовательностей некоторых высокопатогенных видов микроорганизмов. Нечто среднее между полногеномным секвенированием и методом PFGE представляет так называемое полногеномное картирование (Whole Genome Mapping), в котором определяется порядок нахождения в геномных последовательностях сайтов узнавания соответствующих рестрикционных эндонуклеаз. Владея информацией обо всей ДНК микроорганизма ее довольно легко в режиме *in silico* перевести в нужный формат бактериального ДНК-паспорта. Что касается близкородственных штаммов, то может так случиться, что ни один подход генотипирования (кроме полногеномного секвенирования) не выявит между ними генетических отличий, хотя фенотипические будут налицо. И в таких случаях, при работе с важными штаммами микроорганизмов в качестве дополнения к их ДНК-паспортам может быть проведено их полногеномное секвенирование,

которое обеспечит выявление их уникальных особенностей. Однако необходимо иметь в виду, что проведение полногеномного секвенирования с помощью разных платформ, характеризующихся каждая своими особенностями, может дать некоторое расхождение данных, что потребует их дальнейшей валидации. Как видно, большинство рассмотренных выше основных методов определения полиморфизма ДНК позволяют обнаруживать лишь различия генотипов исследуемых штаммов, таксономическое положение и филогенетические связи различных микроорганизмов, не позволяя паспортизировать их. Анализ электрофоретических картин полос ДНК в этих методах рассчитан на выявление их совпадения и ввиду того, что размеры фрагментов ДНК могут быть оценены весьма приблизительно, главное значение приобретает в ДНК-паттерне характер взаимного расположения полос друг относительно друга по принципу – «похоже/не похоже». Однако невозможность строгого соблюдения многочисленных факторов, влияющих на электрофоретическую подвижность фрагментов ДНК, делает подобное сравнение (и особенно результатов, полученных в разных лабораториях) затруднительным и подчас не совсем достоверным. Принципиальной возможностью ДНК-паспортизации бактериальных штаммов обладают, пожалуй, лишь методы fRFLP, AFLP и RFEL, так как здесь обеспечивается точное определение размеров фрагментов ДНК, причем ведущих свое происхождение теоретически из разных частей генома, что дает, как бы, более всеобъемлющую его оценку. Однако и эти методы в своих ныне действующих вариантах не совсем пригодны для паспортизации бактерий. По этой причине задачи, которые решали с помощью данных методов те или иные исследователи, были направлены всего лишь на определение числа биотипов разных видов микроорганизмов и построение филогенетических древ [Herman JP, 1995]. Исходя из того, что требованиям по получению конкретных цифровых данных о полиморфизме ДНК удовлетворяют фактически лишь два

подхода, то проведенное между ними сравнение показало, что метод AFLP более трудоемок, тогда как метод, выбранный для создания генетических паспортов видов и штаммов микроорганизмов, должен быть максимально простым, дешевым и легко доступным многим лабораториям. Проведенный в обзоре анализ некоторых методов выявления полиморфизма ДНК микроорганизмов показал различную степень их пригодности для фингерпринтирования (не для ДНК-паспортизации). Поскольку для массовых исследований немаловажное значение имеет и финансовая сторона. К наиболее дешевым относятся RAPD и Rep-PCR, а AFLP занял по этому показателю промежуточное положение.

Учитывая то, какие уникальные возможности предоставляет обычное штрих-кодирование, можно считать, что и генетическим штрих-кодам для ДНК-паспортизации и ДНК-идентификации штаммов бактерий альтернативы также не существует, и их надо начинать присваивать на основе полиморфизма рестриктазных фрагментов их геномов, как универсальной характеристики, поскольку в любых бактериальных геномах сайты рестрикционных эндонуклеаз будут неизбежно встречаться с той или иной частотой, что и явится основой выявляемого и регистрируемого полиморфизма их ДНК [van Steenbergen T. J., 1991].

Недостатки RFEL-генотипирования штаммов бактерий заключаются в следующем. Главным является неполнота расщепления ДНК рестрикционной эндонуклеазой, но заведомый избыток фермента и высокая степень очистки ДНК должны преодолевать эту ситуацию. После электрофоретического разделения продуктов по распределению фрагментов ДНК можно будет сделать вывод об имевшей место «недорестрикции» и внести коррективы в повторную процедуру. (Впрочем, и в методе AFLP необходим этап рестрикции, а из-за сопровождающей его ПЦР после лигирования адапторов ввиду некоторой избирательности процесса и сглаживания количественных различий

уловить имевшую место недорестриктию гораздо труднее или даже невозможно). Другим недостатком является необходимость для проведения RFEL наличия довольно значительного количества ДНК, что, впрочем, при ДНК-паспортизации/ДНК-идентификации культивируемых штаммов никакой проблемы не представляет. Несколько хуже дело обстоит с некультурабельными микроорганизмами, но в таких случаях крохотные количества выделенной из них ДНК можно амплифицировать до требуемых количеств в изотермических условиях с помощью ДНК-полимеразы фага phi29 и таких методик уже предложено немало. Поскольку при проведении RFEL для рестриктазного расщепления достаточно довольно коротких фрагментов ДНК, то таковые с большей вероятностью и без каких-либо проблем будут нарабатываться при использовании phi29 ДНК-полимеразы. Еще один недостаток, свойственный не только методу RFEL, но и всем прочим, рассчитанным на выявление только части полиморфных локусов, а не на получение информации о всем геноме, включая плазмидные ДНК, заключается в возможном пропуске различий между близкородственными штаммами, поскольку произошедшая в одном из них важная замена нуклеотида(ов) может, например, прийти на совсем другую (неанализируемую) область(и) генома [Whilliams J.G.K., 1990]. Известно, что многие бактерии несут плазмиды и даже мегаплазмиды, которые также могут вносить свой вклад в генетический штрих-код, генерируемый путем RFEL, но при этом плазмиды имеют свойство относительно легко передаваться/теряться, причем это может происходить с внесением или не внесением изменений в штрих-код в зависимости от нуклеотидной последовательности плазмид, хотя штамм, вероятно, приобретет другие свойства. Во всех этих случаях только полногеномное секвенирование даст возможность выявить имеющиеся между такими близкородственными штаммами различия (с учетом допустимых ошибок и оно может не дать), включая наличие плазмидной ДНК, но тогда возникают сложности иного порядка. При этом,

владея информацией обо всей ДНК какой-либо бактерии, ей «рестрикцией» *in silico* может быть присвоен аналогичный генетический штрих-код. Итак, использование метода RFEL для однозначной ДНК-паспортизации и ДНК-идентификации изолятов/штаммов любых бактерий представляется весьма удобным. Можно быть вполне уверенным, что оно останется вполне приемлемым (применимым, востребованным) и после того как массовое секвенирование полных геномов более производительными методами последующих поколений NGS (четвертого, пятого) начнется. Т.е. данный метод RFEL обеспечивает единый подход для ДНК-паспортизации любых штаммов из всех групп бактерий, что принципиально невозможно для всех высших организмов. При этом вероятность случайного совпадения генетических штрих-кодов двух или большего числа неродственных бактерий абсолютно исключены, ввиду обеспечения гигантского числа комбинаций [Gibson K.M., 1998].

1.3. Пробиотики

Пробиотики – живые микробные добавки, которые оказывают благоприятное действие на организм человека и животного путем улучшения кишечного микробного баланса [Fries J.L., 1982], стимулируют обменные и иммунные процессы. Пробиотики считаются эффективным элементом технологии производства безопасной продукции животноводства и птицеводства [Коршунов В.М., 2000].

Пробиотики — в основном бифидобактерии и лактобактерии, но могут быть и другие микроорганизмы, например, дрожжевые грибки.

Пробиотики перспективны в качестве профилактических средств и сопутствующей терапии, но не являются основным средством для лечения заболеваний. Установлено, что применение пробиотиков может оказывать противoinфекционное, иммуномодуляторное воздействие на организм, повышать барьерные функции (физиологические механизмы,

защищающие организм от воздействия окружающей среды, препятствующие проникновению в него бактерий, вирусов и вредных веществ), стимулировать моторику и экскреторную функции кишечника.

В последнее десятилетие концепция пробиотиков претерпела существенные изменения. Возросло внимание исследователей к структурным компонентам и продуктам метаболизма пробиотических микроорганизмов. Данные изменения связаны с расширением представлений о биологической эффективности пробиотиков и обнаружении того факта, что структурные элементы клеток и их метаболиты в ряде случаев оказываются не менее эффективными [Шендеров Б.А., Манвелова М.А., 1997].

1.4. Лакто- и бифидобактерии

Бактерии рода *Lactobacillus* составляют незначительную часть микробиоты кишечника взрослого человека, приблизительно 0,01-0,6% от всех обитателей желудочно-кишечного тракта, однако активно осуществляют регуляторные функции внутри популяции кишечных бактерий и являются представителями нормальной микрофлоры кишечника здоровых людей [Jones B.V., 2010; Saulnier D.M., 2009; Ботина С.Г., 2010].

Лактобациллы являются важным биотехнологическим объектом, они используются в качестве заквасок при производстве кисломолочных продуктов питания (йогурт, простокваша, ряженка и сыры). Лактобациллы широко применяются в составе лекарственных пробиотических препаратов для профилактики кишечных расстройств и вирусной диареи, лечения воспалительных заболеваний кишечника, а также в качестве биологически активных добавок, продуктов функционального питания для человека и кормовых добавок для животных [Gupta V., 2009; Kaur I.P., 2009; Guarino A., 2009]. Род *Lactobacillus* насчитывает около 140 видов, многие из

которых являются комменсалами в составе микробиоты человека и имеют сходные фенотипические и физиологические характеристики, но их геномы сильно различаются по GC-составу, что усложняет идентификацию данного рода [Singh S., 2009; Felis G.E., Dellaglio F., 2007].

В настоящее время идентифицировано более 140 видов лактобацилл: ввиду обширности рода для удобства систематизации выделяют несколько филогенетических групп, каждая из которых объединяет от нескольких до двух десятков видов. Наиболее многочисленны группы *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sakei* [Felis G., Dellaglio F., 2007]. Места обитания лактобацилл чрезвычайно многообразны:

- в молоке, молочных продуктах, в местах переработки молока (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* и другие лактобациллы);

- на поверхности растений как эпифитная микрофлора и на разлагающихся растительных остатках (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*);

- в кишечнике и на слизистых оболочках человека и животных как представители нормальной микрофлоры (*Lactobacillus acidophilus*).

Для начальной идентификации рода, филогенетической группы и вида *Lactobacillus* используют микробиологические и биохимические методы, однако они дают лишь предварительные сведения о систематическом положении данного микроорганизма и часто не позволяют отнести его к определенному виду. Для более точной идентификации микроорганизмов используют разнообразные молекулярно-генетические методы [Singh S., 2009; Ботина С.Г., 2010]. Эти методы можно подразделить на несколько групп.

1. Методы, не связанные с ПЦР: анализ рестрикционных фрагментов хромосомной ДНК (RLFP); разделение суммарного белка клеток в SDS-PAGE электрофорезе; ДНК-ДНК гибридизация, в том числе с использованием чипов (comparative genomic hybridization, CGH) [Markiewicz L.H., 2010].

2. Методы, основанные на реакции ПЦР [Saito S., 2011]. Используются как случайные праймеры (RAPD), так и праймеры для повторяющихся последовательностей ДНК (REP-PCR, ERIC-PCR) и праймеры для определенных генов. В качестве таких генов чаще других используются гены 16S и 23S рибосомальных РНК и спейсерные районы между ними. Используются также некоторые белок-кодирующие гены: *tuf* (ген фактора элонгации Tu), *hscA*, *hsp60* (ген белка теплового шока), *groA* (ген α -субъединицы РНК-полимеразы), *dnaK* (ген белка теплового шока 70 kDa) [Huang C.-H., Lee F.-L., 2011], β -субъединицы F1F0-АТФ синтазы [Sievers M., 2003]. Широко распространен метод, объединяющий анализ рестрикционных фрагментов и ПЦР – т.н. AFLP.

3. Методы, основанные на определении нуклеотидной последовательности (НП) ДНК: определение НП отдельных генов (или их фрагментов) рибосомальной РНК и белок-кодирующих генов, перечисленных в п.2; определение одиночных нуклеотидных замен в таких генах (SNP) [Huang C.-H., 2011]; одновременное определение НП фрагментов нескольких белок-кодирующих генов (MLST) [Raftis E., 2011].

Бифидобактерии являются важными представителями микроорганизмов ЖКТ человека. Бактерии рода *Bifidobacterium* благотворно влияют на все системы организма человека. Функции бифидобактерий [Hindahl M.S., Iglewski B.H., 1986]:

- ингибирование роста условно-патогенных бактерий посредством выработки ацетата и лактата, а также бактерицинов;

- снижение уровня холестерина в крови;
- снижение содержания аммония и аминов;
- синтез и секреция в ЖКТ витаминов группы В, фолиевой кислоты;
- иммуномодулирующая роль.

На сегодняшний день известно 43 вида: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* и др.

Известны зарубежные препараты-эубиотики и кисломолочные продукты – йогурты, включающие в свой состав бифидобактерии видов *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*. Известен препарат, приготовленный из разрушенных клеток бифидобактерий видов *Bifidobacterium infantis* и *Bifidobacterium longum*, обладающий антиопухолевым действием.

В кишечнике человека встречаются 5 видов бифидобактерий – *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve* и *Bifidobacterium infantis*. С наибольшей частотой обнаруживаются виды *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* и *Bifidobacterium adolescentis* (39-75%). У детей грудного возраста в 30% случаев обнаруживаются и бифидобактерии видов *Bifidobacterium breve* и *Bifidobacterium infantis*. Эти виды свойственны только детям грудного возраста.

Высокочувствительные молекулярные методы, основанные на ДНК-технологиях, позволяют определять бифидобактерии в исходном субстрате, в накопительной и в чистой культуре. Однако большинство методов молекулярного анализа в настоящее время основывается на гене малой субъединицы рибосомальной РНК бактерий – 16S рРНК. Одним из способов выявления *Bifidobacterium* является ПЦР с использованием праймеров, подобранных на основе последовательностей 16S rRNA пяти

видов *Bifidobacterium*: *bifidum*, *adolescentis*, *infantis*, *breve* и *longum*. С помощью данного метода можно выявлять не только род, но и вид данных бактерий с учетом точечных мутаций, характерных для рода и видов *Bifidobacterium species*. К недостаткам данного способа можно отнести то, что выявляется только род и вид *Bifidobacterium* и невозможна дифференциация на подвиды.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала использовали штаммы родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*.

2.1. Выделение препаратов ДНК микроорганизмов из клинического материала методом нуклеосорбции.

Выделение ДНК проводят с использованием стандартного набора «ДНК-сорб-АМ» серии «АмплиПрайм» фирмы «Интерлабсервис». Набор реагентов «ДНК-сорб-АМ» — одна из модификаций метода Boom, максимально адаптированная к выделению ДНК из различных типов клинического материала.

Клинический материал обрабатывается лизирующим раствором в присутствии сорбента – частиц силики. В результате происходит деструкция клеточных мембран и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и последующей отмывке. При добавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

Компоненты набора:

- Лизирующий раствор – буферный раствор хаотропного агента. Обеспечивает лизис клинического материала, растворение клеточных и вирусных частиц и высвобождение ДНК.

- Универсальный сорбент – суспензия силики с разрыхлителем в буферном растворе. Силика обеспечивает сорбцию ДНК, растворенной в хаотропном агенте лизирующего раствора. Разрыхлитель препятствует склеиванию силики в присутствии избытка геномной ДНК и слизи клинического материала.

- Отмывочный раствор – водно-спиртовой раствор. Удаляет остатки лизирующего раствора с растворенными ингибиторами ПЦР и другими компонентами клинического материала.

- ТЕ-буфер для элюции – буферный раствор. После добавления к подсушенной силики растворяет сорбированную на ней ДНК.

Подготовка к проведению процедуры экстракции ДНК:

1. Включить термостат и установить температуру 65°C.
2. Лизирующий раствор (если он хранился в холодильнике) следует прогреть, перемешивая при температуре 65°C до полного растворения кристаллов.
3. Подготовить и расставить в штативе необходимое количество одноразовых стерильных полипропиленовых пробирок объемом 1,5 мл и промаркировать их.
4. Подготовить и расставить в штативе пробирки с клиническими образцами. Перед проведением процедуры экстракции нуклеиновых кислот осадить капли материала со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием (1500-3000 об/мин в течение 5 сек), после чего аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе, избегая разбрызгивания и попадания материала на внутреннюю часть крышки.

Процедура экстракции ДНК:

1. Подготовить и расставить в штативе пробирки с клиническим материалом, необходимое количество одноразовых стерильных пробирок объемом 1,5 мл и промаркировать их.
2. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента, после чего внести по 300 мкл лизирующего раствора, используя наконечники с фильтром.
3. Внести по 100 мкл клинического образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром.
4. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе и инкубировать 5 мин при температуре 65°C в термостате. После окончания инкубации содержимое повторно перемешать на вортексе и оставить при комнатной температуре на 2 мин.
5. Осадить сорбент в пробирках центрифугированием при 10 тыс. об/мин в течение 30 сек. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без фильтра.
6. Добавить в пробы по 1 мл отмывочного раствора, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.
7. Повторить пункт 5.
8. Поместить пробирки в термостат с температурой 65°C на 5-10 мин для подсушивания сорбента, при этом крышки пробирок должны быть открыты.
9. В пробирки добавить по 100 мкл TE-буфера для элюции ДНК, используя для этого наконечник с фильтром. Перемешать на вортексе до

полного ресуспендирования сорбента. Поместить в термостат с температурой 65°C на 5 мин.

10. Центрифугировать пробирки при 12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

11. Полученные пробы можно хранить в течение 1 недели при температуре 2-8°C или в течении года при температуре не выше -16°C.

2.2. Выделение препаратов ДНК микроорганизмов из клинического материала методом с использованием смолы Chelex.

Процедура заключается в очистке ДНК от металлосодержащих соединений и протеинов путем кипячения в присутствии Chelex 100, затем супернатант непосредственно добавляют в ПЦР-смесь. Недостатком является низкое качество выделенного по способу препарата ДНК из-за наличия посторонних примесей (продуктов лизиса клеток), невозможность выделения ДНК из костных и мышечных тканей, загрязнение препарата ДНК продуктами лизиса клеток (белки, липиды).

Подготовка к проведению процедуры экстракции ДНК:

1. Включить термостат и установить температуру 95°C.
2. Подготовить и расставить в штативе необходимое количество одноразовых стерильных полипропиленовых пробирок объемом 1,5 мл и промаркировать их.
3. Подготовить и расставить в штативе пробирки с клиническими образцами.

Процедура экстракции ДНК:

1. В подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки внести по 200 мкл смолы Chelex.
2. Внести в каждую пробирку по 75 мкл каждого из образцов.
3. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе и инкубировать 20 мин при температуре 95°C в термостате. После окончания инкубации содержимое повторно перемешать на вортексе.
4. Осадить сорбент в пробирках центрифугированием при 14,5 тыс. об/мин в течение 5 мин.

2.3. Выделение препаратов ДНК микроорганизмом фенол-хлороформным методом.

Фенол-хлороформный метод экстракции ДНК считается стандартным.

Процедура экстракции ДНК:

1. Нарботка культуры в больших объемах.
2. 150 мл среды с культурой центрифугировать 5 минут при 10 тыс. об/мин.
3. Осадок растворить в 5 мл 1 раствора.
4. Добавить 10 мл 2 раствора и оставить на 30 минут в холодильнике.
5. Добавить 15 мл изопропанола, перемешать на вортексе, отцентрифугировать, спирт слить.

6. Добавить 10 мл ТЕ буфера и перемешивать до полного растворения.
7. Добавить 5 мл хлороформа + 5 мл фенола (взбалтывать 30 минут).
8. Центрифугировать 5 минут при 10 тыс. об/мин.
9. Надосадочную жидкость перенести в новую пробирку и добавить 10 мл хлороформа (взбалтывать 10 минут), для удаления остатков фенола.
10. Центрифугировать 5 минут при 10 тыс. об/мин.
11. Надосадочную жидкость перенести в новую пробирку, добавить 3 V спирта 96%, оставить на час в морозильнике.
12. Центрифугировать 5 минут при 10 тыс. об/мин. Спирт слить, осадок подсушить при комнатной температуре.
13. Добавить 0,5 мл mQ, перемешать на вортексе до растворения осадка и перенести в эппендорф. Очищенную ДНК, готова к постановке ПЦР.

Все методики показали достаточно качественное выделение ДНК. По скорости и стоимости реагентов нами рекомендуется выделять ДНК из исследуемых объектов с помощью методом хелатирования двухвалентных ионов металлов смолой Chelex-100.

2.4. Подбор праймеров

Подобранные видоспецифичные праймеры для определения видовой принадлежности лакто- и бифидобактерий:

acidophF	ctagtgcaatccgtagagatacggag
acidophR	aagagattcgttgccttcgaggc
brevisF	gaacaccttgagagtaactgttcaaggg
brevisR	ggaacgtcttatctetaagattgcag
delbruF	ctgcgctacacctagagataggagg
delbruR	gagatccgcttaccctcgcgggtt
caseiF	gatcgggtgcttgcaccgagattcaacatg
plantarF	cataacaacttgaccgcatgggtccgagc
plantarR	caatacctgaacagttactctcagatatg
fermentF	cataacagcgttgctcgcataacaacgc
fermentR	caacgtatgaacagttactctcatacgtg
adolescF	gatgcatgtccttctgggaaagattca
adolescR	ttaagggatccgctccccctcacgag
angulatF	cgggatcggctggagcttgctccggcc
angulatR	tgggccgttaccgccgactac
animaliF	cgggatccctggcagcttgctgtcggg
animaliR	atccactcaacacggccgaaaccgtgc
bifidumF	cggatgtccacatgatcgcgatgtga
bifidumR	cccgaagggaacgccatctctggcg
breveF	gatgctccatcacaccgcatgggtgtgt
breveR	tcgaaaggtactcaacacaaagtgc
longumF	gatgtccagttgatcgcgatggcttc
longumR	cttattcaacgggtaaacactcactcacg

2.5. RAPD-анализ

ПЦР-амплификацию участков ДНК осуществляли с использованием стандартных наборов на амплификаторе «Терцик МС-2», «ДНК-технология» (г. Москва).

Реакционная смесь объемом в 22 мкл содержала 3 мкл исследуемого образца ДНК, 2,5 мкл буфера (67 мМ трис-НСl, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 1,5 мМ MgCl₂, 0,01% Tween-20), 2,5 мкл dNTP, 1 мкл праймера, 1 мкл Taq-полимеразы и 15 мкл mQ. Для предотвращения испарения смеси в процессе реакции в каждую пробирку добавили по одной капле минерального масла.

На ДНК-амплификаторе запустили две необходимые программы для соответствующих праймеров со следующими параметрами:

1. Для AFK1, AFK3 и LMBD
 - 1) Начальная денатурация 95°C – пауза
 - 2) 37 циклов амплификации:
 - денатурация 95°C – 20 сек,
 - отжиг 33°C – 30 сек,
 - элонгация 72°C – 45 сек.
 - 3) Достаивание цепей ДНК 72°C – 2 мин, 1 цикл.
2. Для ERIC и BOX
 - 1) Начальная денатурация 95°C – пауза
 - 2) 30 циклов амплификации:
 - денатурация 95°C – 20 сек,
 - отжиг 55°C – 20 сек,
 - элонгация 72°C – 60 сек.
 - 3) Достаивание цепей ДНК 72°C – 2 мин, 1 цикл.

После окончания ПЦР провели агарозный гель-электрофорез.

2.6. Электрофорез

Агарозные гели, как правило, применяют для разделения ДНК размером более 1 т.п.н.

Приготовление агарозного геля:

- 1) Смешать 1 г агарозы в 100 мл H_2O , добавить 2 мл 50X TAE
- 2) Нагреть на водяной бане или в микроволновке до полного растворения агарозы.
- 3) Остудить раствор приблизительно до $45^{\circ}C$.
- 4) Приготовить ванночку для заливки геля и установить в ней гребенку для формирования лунок.
- 5) Залить расплав геля в ванночку и оставить до полной полимеризации геля.
- 6) Аккуратно вынуть гребенку и перенести гребенку в камеру для электрофореза.
- 7) Залить в камеру электродный буфер так, чтобы слой буфера над гелем был 1 мм.
- 8) Добавить в анализируемые образцы по 8 мкл красителя тщательно перемешать и нанести в лунки.
- 9) Подать необходимое напряжение на электроды. ДНК движется от (-) к (+).
- 10) Электрофорез проводить в течение 30-50 минут, затем вынуть гель из формы и поместить в кювету для окрашивания. Налить в кювету слабый раствор бромистого этидия. Окрашивать в течение 10-15 мин.

11) Слить краситель в колбу. Промыть гель проточной водой. Поместить его на стекло УФ-трансиллюминатора. Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа. Сфотографировать гель при помощи цифрового фотоаппарата.

2.7. Компьютерный анализ

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей проводили при помощи пакета компьютерных программ «Lasergene» фирмы «DNASTAR, Inc» (США).

Нуклеотидные последовательности гельминтов для сравнительного анализа были взяты из Международной базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank.

Подбор праймеров и оптимальных условий для ПЦР проводили с помощью программы PrimerSelect из пакета программ Lasergene, выравнивания сиквенсов, проводили с помощью программы Megalin (Lasergene) фирмы DNASTAR, Inc. (США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для типирования штаммов бактерий, предварительно охарактеризованных как лакто- и бифидобактерии были разработаны системы фингерпринтирования на основе RAPD-, BOX- и ERIC-анализов.

Метод RAPD используется для анализа генетического полиморфизма геномов бактерий.

По сравнению с другими методами RAPD-PCR имеет ряд преимуществ:

- 1) относительная простота,
- 2) короткое время анализа (несколько часов),
- 3) относительная дешевизна в реактивах и оборудовании.

Метод RAPD представляет собой понижение сложности амплификации ДНК с помощью ПЦР. Для генома, состоящего из повторяющихся и уникальных последовательностей, сложность генома (используют для описания всевозможных присутствующих в нем последовательностей ДНК) определяется в виде нормированной суммы всех последовательностей.

Сложность генома определяет скорость гибридизации уникальных последовательностей с препаратами ДНК. В этой связи специфическое селективное понижение сложности препарата ДНК могло бы ускорить и облегчить проведение его анализа с помощью гибридизации. Решение этой проблемы затрудняется тем, что исследователь редко располагает достаточным количеством информации о последовательностях ДНК анализируемого генома с неизвестной первичной структурой для осуществления выбора его представительной части с целью дальнейшего использования при амплификации с помощью ПЦР.

Несмотря на нетривиальный характер задачи, в настоящее время имеется методический подход, позволяющий с помощью ПЦР понижать сложность образца ДНК без каких либо предварительных знаний о его первичной структуре. Метод получил название случайной амплификацией полиморфных последовательностей ДНК (Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD). Метод основан на использовании в ПЦР коротких праймеров со случайной последовательностью нуклеотидов. При этом в конкретной ПЦР чаще всего используется только один праймер. В этом случае продукт ПЦР будет образовываться, если инвертированные повторяющиеся последовательности, которые содержат в себе сайт посадки такого праймера, будут располагаться в анализируемом геноме достаточно близко друг от друга, на расстоянии, допускающем эффективное прохождение ПЦР. Приняв такое расстояние равным 2 т.п.о., исходя из статистических расчетов вероятности встречаемости в геноме размером $3 \cdot 10^9$ п.о. двух одинаковых случайных последовательностей конкретной длины, можно теоретически определить число соответствующих ампликонов в таком геноме. Этот метод успешно используется для поиска информативных полиморфных маркеров, пригодных для физического картирования геномов животных и растений, а также идентификации организмов.

Для использования в RAPD-анализе праймеры выбирались из предварительно подобранных коротких олигонуклеотидов по количеству нарабатываемых полос при амплификации ДНК при их использовании. Таким образом, из 10 коротких олигонуклеотидов нами были выбраны три наиболее удовлетворяющих наши требования:

LMBD	gggcgctg
AFK3	gcgtccattc
AFK1	acggtggacg

С использованием данных праймеров был проведен анализ 7-ми штаммов, фенотипически охарактеризованных как лакто- и бифидобактерии (рис. 1). Из результата анализа видно, что представленности полос вполне достаточно для выявления генетических отличий между исследуемыми объектами, из чего следует, что выбранные праймеры вполне подходят для RAPD-анализа штаммов лакто- и бифидобактерии для их генетического сравнения.

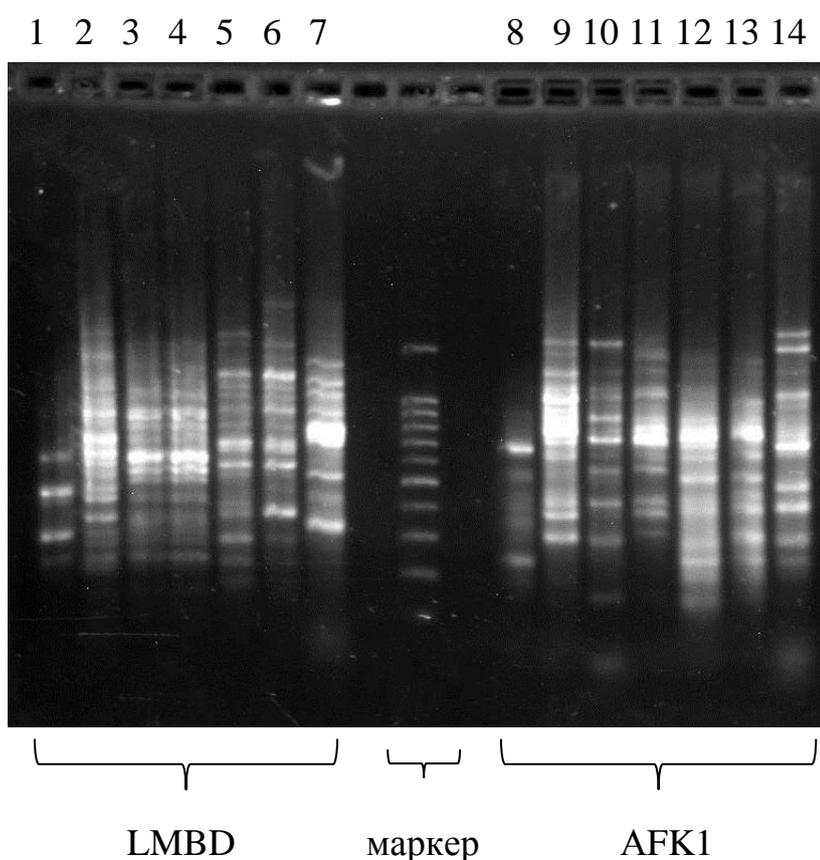


Рисунок 1. RAPD-анализ штаммов *Bifidobacterium* (1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11) и *Lactobacillus* (5, 6, 7, 12, 13, 14).

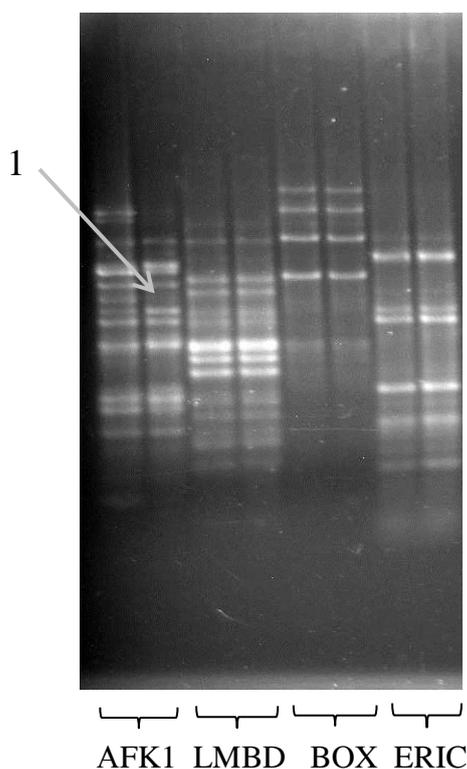


Рисунок 2. Сравнение двух штаммов *Lactobacillus*: 1 – отсутствие полосы.

Например, с использованием праймера AFK1 нами были обнаружены даже незначительные отличия между производными одного штамма (рис.2).

Таким образом, метод RAPD вполне может быть использован для выявления наличия/отсутствия генетических различий между изолятами пробиотических бактерий.

В геноме прокариот встречаются некоторые повторяющиеся генетические элементы, количество и расстояние между которыми у разных видов микроорганизмов имеет свое определенное значение. Подбрав к таким генетическим элементам праймер можно получить продукты амплификации с индивидуальным для каждого микроорганизма спектром полос. Одними из таких методов являются BOX-PCR (Box elements), ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus).

Праймеры ERIC успешно используют для анализа меж- и внутривидовых различий бактериальных геномов. Генетические перестройки приводят к тому, что в ходе ERIC-ПЦР могут образовываться профили ампликонов, которые отличаются не только у разных видов микроорганизмов, но и представителей одного вида [Saxena M.K., 2002].

Метод BOX-ПЦР, предполагающий амплификацию повторяющихся BOX-элементов, также широко используется для видовой идентификации и штаммовой дифференциации микроорганизмов [Farber J.M., 1996].

Для BOX- и ERIC-анализов последовательности праймеров были взяты из литературных источников (табл.1) [Versalovic J., 1991; Ranjbar R., 2011; Versalovic, J., 1994].

Таблица 1. Специфичные праймеры на внутригеномные консенсусные последовательности энтеробактерий (enterobacterial repetitive intergenic consensus) и BOX элементы

ERICF	atgtaagctcctggggattcac
ERICR	aagtaagtgactggggtgagcg
BOXA1R	ctacggcaaggcgacgctgacg

Для выявления видовой принадлежности были подобраны видоспецифичные праймеры, подобранные к варибельным участкам гена 16S рибосомальной РНК. Для этого была проведена работа по сравнительному анализу данных генов лакто- и бифидобактерий с другими представителями прокариотического мира. В ходе данной работы были выявлены консервативные и варибельные участки взятых в анализ последовательностей. Поскольку в международном банке данных нуклеотидных последовательностей GenBank на сегодняшний день имеется значительное количество задепонированных последовательностей генов 16S рРНК лакто- и бифидобактерий каждого вида и часто

встречаются недостоверные последовательности, параллельно была проведена работа по сравнительному анализу последовательностей 16S рРНК принадлежащих одному виду. Так, для каждого вида лакто- и бифидобактерий из GenBank было получено 20-30 последовательностей. Среди данных последовательностей по результатам сравнительного анализа подбирали консенсусную последовательность, которая в дальнейшем участвовала в подборе видоспецифичного праймера.

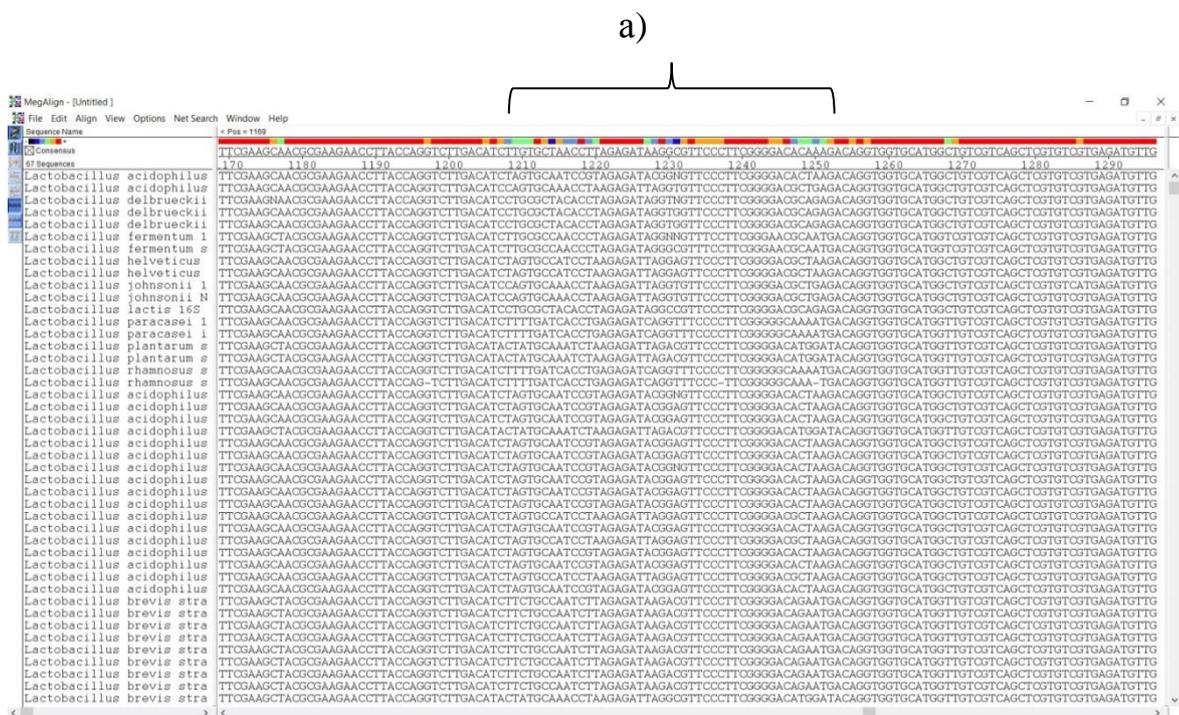


Рисунок 3. Сравнительный анализ последовательностей генов 16S рРНК лактобактерий: а) – переменные участки генов 16S рРНК *Lactobacillus* spp., к которым подбирались видоспецифичные праймеры.

Нами в ходе проделанной работы было проанализировано в общей сложности 390 последовательностей.

Поскольку переменные участки генов 16S рРНК, к которым подбирались видоспецифичные праймеры, приходится в основном на последовательности, образующие стебли шпичечных структур рРНК, то в составе праймеров содержатся взаимодополнительные участки. Для того, чтобы исключить взаимодостройку праймеров в начале процедуры ПЦР,

амплификацию с использованием данных праймеров следует применять с горячим стартом. Для этого была оптимизирована методика ПЦР с разделенными смесями с помощью парафина. Температура плавления парафина для используемых праймеров должна составлять 60-65°C, что позволит смешаться компонентам реакционной смеси при указанной температуре, при которой димеры праймеров находятся в денатурированном состоянии.

Таким образом, нами были подобраны видоспецифичные праймеры для следующих видов бактерий:

- *Lactobacillus acidophilus*,
- *Lactobacillus brevis*,
- *Lactobacillus delbrueckii*,
- *Lactobacillus casei*,
- *Lactobacillus plantarum*,
- *Lactobacillus fermentum*,
- *Bifidobacterium adolescentis*,
- *Bifidobacterium angulatum*,
- *Bifidobacterium animalis*,
- *Bifidobacterium bifidum*,
- *Bifidobacterium breve*,
- *Bifidobacterium longum*



Рисунок 4. Проверка специфичности праймеров, подобранных к гену 16S рРНК *Bifidobacterium longum* и *Lactobacillus plantarum*: 1 – праймеры longumF, longumR (ДНК *Bifidobacterium longum*), 2 – праймеры plantarF, plantar (ДНК *Lactobacillus plantarum*), 3 – смесь ДНК других видов лакто- и бифидобактерий.

На контрольных образцах была показана высокая специфичность полученных тест систем (рис.4).

Также была проделана работа по выбору метода выделения ДНК и исследуемых бактерий. Было опробовано три наиболее распространенных метода выделения нуклеиновых кислот из бактерий, отличающихся как чистотой получения препарата, стоимостью реагентов (набора) и скоростью самой процедуры.

На сегодняшний день существует множество способов выделения ДНК. Основными критериями, предъявляемыми при выборе метода, являются его быстрота, качество и стоимость. Рассмотрим 2 широко применяемых метода при работе с микроорганизмами. Первый из методов предложенный Бумом (Boom) основан на сорбции ДНК на частичках силикогеля (SiO_2) в присутствии 4-6 М гуанидинтиоционата. Лизирующим агентом в данном случае служит Triton X100, содержащийся в лизирующем буфере в концентрации 0,5-1%. В свою очередь гуанидинтиоционат 4-6 М концентрации за счет своих хаотропных свойств

также способствует лизированию клеток. В дальнейшем при добавлении суспензии силикогеля на их частицах происходит сорбция нуклеиновых кислот (НК). При центрифугировании комплекс $\text{SiO}_2 + \text{НК}$ уходит в осадок, а надосадочную жидкость, содержащую все остальные компоненты клеток становится возможным удалить. Для избавления от остатка гуанидинтиоционата осадок промывают в 70% этиловым спиртом в присутствии которого комплекс $\text{SiO}_2 + \text{НК}$ не разрушается и при центрифугировании также уходит в осадок. Надосадочная жидкость также удаляется. При добавлении к комплексу воды, НК переходят в растворимую форму, тем самым освобождаясь от частичек силикогеля. Для лучшего перехода НК в раствор суспензию комплекса в воде можно нагреть до 65°C .

Таким образом, нами в данной работе показано, что с помощью фингерпринт-анализа можно выявлять даже незначительные генетические различия между штаммами микроорганизмов, а применение видоспецифичных праймеров намного упрощает процесс идентификации изолятов пробиотических лакто- и бифидобактерий.

ВЫВОДЫ

1. С помощью сравнительного анализа последовательностей генов 16S рРНК лакто- и бифидобактерий были выявлены переменные участки для подбора к ним видоспецифичных праймеров.
2. Полученные праймеры являются видоспецифичными и могут использоваться для оценки генетической идентичности культур лакто- и бифидобактерий.
3. Для оценки генетической идентичности культур лакто- и бифидобактерий могут использоваться BOX-ПЦР, ERIC-ПЦР и RAPD, однако более информативным является метод случайной амплификации полиморфных фрагментов ДНК (RAPD).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ботина С.Г., Климина К.М., Коробан Н.В., Амерханова А.М., Зинченко В.В., Даниленко В.Н. Реклассификация отечественных пробиотических культур бактерий рода *Lactobacillus*. Генетика, 2010, 46, 11, 1485-1492.
2. Ботина С.Г., Коробан Н.В., Климина К.М., Глазова А.А., Захарович Н.В., Зинченко В.В., Даниленко В.Н. Генетическое разнообразие бактерий рода *Lactobacillus* из гастроинтестинальной микробиомы людей. Генетика, 2010, том 46, №12, с.1-9.
3. Коршунов В.М., Володин Н.Н., Ефимов Б.А. и др. Характеристика биологических препаратов и пищевых добавок для функционального питания и коррекции микрофлоры кишечника. Микробиология. – 2000. – № 3. – С. 86–91.
4. Сидоренко С.В., Соломка В.С., Кожушная О.С., Фриг Н.В.. Методы типирования возбудителей инфекций, передаваемых половым путем. Москва, 2010.
5. Федоров А.Н., Гречко В.В., Слободянюк С.Я., Федорова Л.В., Тимохина Г.И.. 1992. Таксономический анализ повторяющихся элементов ДНК // Мол. биол. Т. 26. Вып. 2. С. 464-469.
6. Шагинян И.А., Гинцбург А.Л. ПЦР-генетическое типирование возбудителей бактериальных инфекций. Генетика 1995; 31:600-10.
7. Шендеров Б.А., Манвелова М.А. Функциональное питание и пробиотики: микрoэкологические аспекты. – М.: Агар, 1997. – 24 с.
8. Akkale C., Yildirim Z., Yildirim M.B., Kaya C., Öztürk G., Bahattin T. Assessing genetic diversity of some potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes grown in Turkey using the AFLP marker technique. Turkish J. Field Crops, 2010, 15(1): 73-78.

9. Arbeit R.D., Maslow J.N., Mulligan M.E., Polymerase chain reaction – mediated genotyping in microbial epidemiology. *Clin Infect Dis* 1994; 18:1018-9.
10. Baggesen DL, Sørensen G, Nielsen EM, Wegener HC. Phage typing of *Salmonella Typhimurium* - is it still a useful tool for surveillance and outbreak investigation? *Eurosurveillance*. 2010.
11. Berthier F. Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA F. Berthier, S.D. Ehrlich *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999. – Vol. 49. – P. 997–1007.
12. Bikandi J, San Millan R, Rementeria A, Garaizer J (2004). In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics*, 798-799.
13. Bouvet P. J., Grimont P. A. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987; 138: 569—578.
14. Caetano – Anolles G., Bassam B.J., Gresshoff P.M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio Technol* 1991; 9:553 – 7.
15. Enright, M. C., and Spratt, B. G. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* 7, 482-487.
16. Farber J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J. Food Prot.* – 1996. – № 59. – P. 1091–1101.
17. Felis GE, Dellaglio F. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2007 Sep; 8(2):44-6.
18. Fries J.L., Murphy W.A., Sueiras-Diaz J., Coy Peptides D.H. Somatostatin antagonist analog increases GH, insulin, and glucagon release in the rat. – 1982. – Vol. 3, № 5. –P. 811–814.
19. Gaston M. A., Hunter P. R. Efficient selection of tests for bacteriological typing schemes. *J Clin Pathol* 1989; 42: 763—766.

20. Gibson KM, Hoffmann GF, Hodson AK, Bottiglieri T, Jakobs C. 1998. 4-hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism. *Neuropediatrics* 29:14–22.
21. Guarino A, Lo Vecchio A, Canani RB. Probiotics as prevention and treatment for diarrhea. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009, 25 (1), 18-23.
22. Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol*. 2009, 27 (3), 202-9.
23. Herman JP, Watson SJ (1995) Stress regulation of mineralocorticoid receptor heteronuclear RNA in rat hippocampus. *Brain Res* 677:243–249.
24. Hindahl M.S., Iglewski B.H. Outer membrane proteins from *Legionella pneumophila* serogroups and other *Legionella* species. *Infection and immunity*. 1986, 51(1): 94-101.
25. Hu J., van Eysden J., Quiros C.F. Generation of DNA-based markers in specific genome regions by two-primer RAPD reactions *PCR Methods Appl.* – 1995. – Vol. 4. – P. 346–351.
26. Huang C.-H., Chang M.-T., Huang M.-C., Lee F.-L. Rapid identification of *Lactobacillus plantarum* group using the SNaPshort minisequencing. *Systematic and applied microbiology*, 2011, 34, 586-589.
27. Huang C.-H., Lee F.-L. The *dnaK* gene as a molecular marker for the classification and discrimination of the *Lactobacillus casei* group. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2011, 99, 319-327.
28. Hunter P. R., Gaston M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2465—2466.
29. Jones B.V., Sun F., Marches J.R. Comparative metagenomic analysis of plasmid encoded functions in the human gut microbiome *BMC Genomics* 2010, 11:46.
30. Kaur IP, Kuhad A, Garg A, Chopra K. Probiotics: delineation of prophylactic and therapeutic benefits. *J Med Food*. 2009, 12 (2), 219-35.

31. Kim P., Leckman J.F., Mayes L.C., Feldman R., Wang X., Swain J.E. The plasticity of human maternal brain: Longitudinal changes in brain anatomy during the early postpartum period. *Behavioral Neuroscience*, 2010, 124: 695-700.
32. Maiden et al., 1998 Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *PNAS* 95:3140-3145.
33. Markiewicz L.H., Biedrzycka E., Wasilewska E., Bielecka M. Rapid molecular identification and characteristics of *Lactobacillus* strains. *Folia Microbiol.*, 2010, 55, 5 481-488.
34. Olive D.M., P.Bean. Principles and application of methods for DNA – based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1661 – 9.
35. Owen R. J., Sutherland K., Fitzgerald C. et al. Molecular subtyping scheme for serotypes HS1 and HS4 of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 872—877.
36. Paun O., Schönswetter P. Amplified fragment length polymorphism: an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic, and epigenetic studies. *Methods Mol. Biol.*, 2012, 862: 75-87.
37. Portis E., Acquadro A., Comino C., Lanteri S. Effect of farmer’s seed selection on genetic variation of landrace population of pepper (*Capsicum annuum* L.), grown in NorthWest Italy. *Genet. Res. Crop Evol.*, 2004, 51: 581-590.
38. Prakash S. Bisen, Mousumi Debnath, G. B. Prasad. *Microbes: Concepts and Applications* 2012.
39. Raftis E., Salvetti E., Torriani S., Felis G.E., O'Toole P.W. Genomic diversity of *Lactobacillus salivarius*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77, 3, 954-965.
40. Renganayaki K., Read J.C., Fritz A.K. Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 2001, 102: 1037-1045.

41. Ranjbar R., Rahbar M., Naghoni A., Farshad S., Davari A., Shahcheraghi F. A cholera outbreak associated with drinking contaminated well water. *Arch Iran Med.* 2011; 14(5):339-40.
42. Saito S., Kobayashi M., Kimoto-Nira H., Aoki R., Mizumachi K., Miyata S., Yamamoto K., Kitagawa Y., Suzuki C. Intraspecies discrimination of *Lactobacillus paraplantarum* by PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 316, 70-76.
43. Saulnier DM, Kolida S, Gibson GR. Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. *Curr Pharm Des.* 2009, 15 (13), 1403-1414.
44. Saxena M.K et al. Strain differentiation of Indian isolates of *Salmonella* by ERIC-PCR. *Res Vet Sci.* – 2002. – Vol.73. – 313-314.
45. Selander R. K., Caugant D. A., Ochman H. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics 96. *Appl Environ. Microbiol* 1986; 51: 873—884.
46. Sensi E., Vignani R., Scali M., Masi E., Cresti M. DNA fingerprinting and genetic relatedness among cultivated of *Oleaeuropaea* L. estimated by AFLP analysis. *SciHort.*, 2003, 97: 379-388.
47. Sievers M, Uermösi C, Fehlmann M, Krieger S. Cloning, sequence analysis and expression of the F1F0-ATPase beta-subunit from wine lactic acid bacteria. *Syst Appl Microbiol.*, 2003, 26, 3, 350-6.
48. Singh S, Goswami P, Singh R, Heller K.J. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review *LWT - Food Science and Technology*, 2009, 42, 448-457.
49. Soleimani V.D., Baum B.R., Johnson D.A. Identification of Canadian durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum (Desf) Husn.) cultivars using AFLP and their STS markers. *Can. J. Plant Sci.*, 2002, 82: 35-41.

50. Stanley J., Linton D., Desai M. et al. Molecular subtyping of prevalent M serotypes of *Streptococcus pyogenes* causing invasive disease. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2850—2855.
51. Tümbilen Y., Frary A., Mutlu S., Doğanlar S. Genetic diversity in Turkish eggplant (*Solanum melongena*) varieties as determined by morphological and molecular analyses. *Int. Res. J. Biotechnol.*, 2011, 2(1): 16-25.
52. Urwin R., Maiden M.C., 2003, Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.*, 11, 479-487.
53. Van Bergen P., Janssen P.M., Hoogerhout P., De Wildt D.J., Versteeg D.H. Cardiovascular effects of gamma-MSH ACTH-like peptides: structure-activity relationship *Eur. J. Pharmacol.*, 1995, v. 294, N 2-3, p. 795-803.
54. Van Steenberghe, T. J.; Van der Velden, U.; Abbas, F. and de Graaff, J. (1991): Microflora and bacterial DNA restriction enzyme analysis in young adults with periodontitis, *J Periodontol*, (vol. 62), No. 4, pp.235-41.
55. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(24):6823-31.
56. Versalovic, J., M. Schneider, F.J. de Bruijn and J.R. Lupski. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based-polymerase chain reaction. *Methods Cell. Mol. Biol.*, 1994; 5: 25-40.
57. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.*, 1995, 23: 4407-4414.
58. Wang F., Li F., Wang J., Zhou Y., Sun H. Genetic diversity of the selected 64 potato germplasms revealed by AFLP markers. *Mol. Plant Breed.*, 2011, 12(4): 22-29.
59. Welsh J., McClelland. Genomic fingerprinting genomes using arbitrary primed PCR and matrix of pairwise combinations of primers *NAR.* – 1991. – Vol. 19. – N 19. – P. 5275–5279.

60. Whilliams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are usefulas genetic markers // NAR. – 1990. – Vol. 18. – P. 6531–6535.

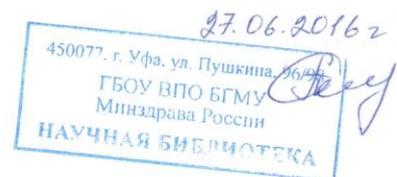
61. Willems A., Doignon - Bourcier F., Coopman R., Hoste B., De Lajudie P., Gillis M. AFLP fingerprint Analysis of Bradyrhizobium strains isolated from Faidherbia albida and Aeschynomene species. System. Appl. Microbiol., 2000, 23: 137-147.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Информация о документе:

Имя исходного файла: Кенджиева_диплом 1.docx
Имя компании: Башкирский государственный медицинский университет
Тип документа: Прочее
Имя документа: КЕНДЖИЕВА
Дата проверки: 27.06.2016 11:51
Модули поиска: Интернет (Антиплагиат), Диссертации и авторефераты РГБ, Модуль поиска ЭБС "Лань", Башкирский государственный медицинский университет, Кольцо вузов
Текстовые статистики:
Индекс читаемости: очень сложный
Неизвестные слова: в пределах нормы
Макс. длина слова: выше нормы!
Большие слова: выше нормы!

Оригинальные блоки: 81.86%
Заимствованные блоки: 18.14%
Заимствование из "белых" источников: 0%
Итоговая оценка оригинальности: **81.86%**



ОТЗЫВ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Кенджиевой Али Абдулжалиловны.

Дифференциация штаммов и видов микроорганизмов – актуальная задача микробиологии и эпидемиологии. Методы идентификации бактерий, основанные на фенотипических признаках, ПЦР, фрагмент-анализе в большинстве случаев не характеризуются высоким значением коэффициента дифференциации и воспроизводимостью, требуют применения в каждом эксперименте референсных штаммов. Генотипирование на основе секвенирования фрагментов генома микроорганизмов свободно от указанных недостатков, что открывает более широкие возможности в идентификации штаммов. Одной из методик, позволяющих оценить генотипический полиморфизм штаммов, в данной работе явилось генотипирование штаммов лакто- и бифидобактерий с помощью ПЦР со случайными праймерами (RAPD-анализ).

За время подготовки дипломной работы Кенджиева А.А. проявила себя как научный работник, способный творчески мыслить, анализировать явления и решать научно-практические задачи. Студентом было продемонстрировано умение самостоятельно проводить экспериментальные исследования и осуществлять их глубокий теоретический анализ. В процессе работы над дипломом Кенджиева А.А. самостоятельно проработала значительный объем отечественных и зарубежных литературных данных, освоила целый ряд современных микробиологических, молекулярно-биологических, иммунологических, лабораторно-клинических и статистических методов исследования.

Дипломная работа Кенджиевой А.А. выполнена на должном уровне и рекомендуется к защите.

Научный руководитель:
зав. кафедрой фундаментальной
и прикладной микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ
д.м.н., профессор



Мавзютов А.Р.

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Кенджиевой Алии Абдулжалиловны.

Актуальность избранной темы. Дифференциация штаммов и видов микроорганизмов – актуальная задача микробиологии и эпидемиологии. Методы идентификации бактерий, основанные на фенотипических признаках, ПЦР, фрагмент-анализе в большинстве случаев не характеризуются высоким значением коэффициента дифференциации, нередко плоховоспроизводимы, требуют применения в каждом эксперименте референсных штаммов. Генотипирование на основе секвенирования фрагментов генома микроорганизмов лишено указанных недостатков, что открывает более широкие возможности в идентификации штаммов. Одной из методик, позволяющих оценить генотипический полиморфизм штаммов, в данной работе явилось генотипирование штаммов лакто- и бифидобактерий с помощью ПЦР со случайными праймерами (RAPD-анализ).

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в дипломной работе. Основные научные положения, выводы и практические рекомендации сформулированы исходя из решённых в ходе исследования задач. В частности подобраны видоспецифические праймеры к консервативным генам лакто- и бифидобактерий для их идентификаций. Также проведена оценка специфичности подобранных праймеров на контрольных образцах. Осуществлена возможность применение методов молекулярного фингерпринтирования для выявления генетических различий между штаммами пробиотических микроорганизмов.

Достоверность и новизна исследования. Значимость полученных результатов для науки и практики. Полученные экспериментальные данные проанализированы с использованием современных программных продуктов и оборудования. Их достоверность не вызывает сомнения. Учитывая актуальность разрабатываемой проблемы, установленные в ходе исследования результаты представляют научный интерес, способствуют разработке новых способов оценки не только штаммов нормофлоры, но и патогенных бактерий.

Заключение. Проект Кенджиевой А.А. соответствует предъявляемым требованиям, рекомендуется к защите и заслуживает положительной оценки.

Рецензент:

к.б.н., ст. преподаватель кафедры
фундаментальной и прикладной
микробиологии ГБОУ ВПО БГМУ
Минздрава России



Ю.Л.Баймурзина

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Кенджиевой Али Абдулжалиловны.

Дифференциация штаммов и видов микроорганизмов – актуальная задача микробиологии и эпидемиологии. Методы идентификации бактерий, основанные на фенотипических признаках, ПЦР, фрагмент-анализе в большинстве случаев не характеризуются высоким значением коэффициента дифференциации, воспроизводимостью, требуют применения в каждом эксперименте референсных штаммов. Генотипирование на основе секвенирования фрагментов генома микроорганизмов лишено указанных недостатков, что открывает более широкие возможности в идентификации штаммов. Одной из методик, позволяющих оценить генотипический полиморфизм штаммов, в данной работе явилось генотипирование штаммов лакто- и бифидобактерий с помощью ПЦР со случайными праймерами (RAPD-анализ). Показаны прикладные возможности данного метода для сравнения генетической идентичности экспериментально модифицируемых.

В теоретической главе работы Кенджиевой А.А. была тщательно проработана необходимая литература, включая зарубежные источники, а затем изложены цели, задачи исследования.

В практической части работы подробно описаны методика выделения ДНК, подбора праймеров, проведения RAPD-, BOX- и ERIC-анализов.

Кенджиева А.А. успешно справилась с решением поставленных в работе задач исследования. Дипломная работа хорошо иллюстрирована, имеются фото гель-электрофорезов, цифровые данные приведены в соответствующих таблицах. Работа изложена грамотно и логично, включает 1 приложение.

При написании дипломной работы показан достаточный уровень теоретической и практической подготовки. В работе имеются незначительные неточности, не носящие принципиального характера.

Дипломный проект Кенджиевой А.А. соответствует предъявляемым требованиям, рекомендуется к защите и заслуживает положительной оценки.

Рецензент:

Старший научный сотрудник
ФБУН ИБГ УНЦ РАН,
с.н.с., к.б.н.



Ю.М.Никоноров