

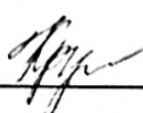
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «КубГУ»)

Кафедра генетики, микробиологии и биотехнологии

КУРСОВАЯ РАБОТА № 1


МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ ПРИЗНАКОВ У БАКТЕРИЙ

Работу выполнила _____  3.05.18 _____ М. Н. Круглова
(подпись, дата)

Факультет биологический, курс 3

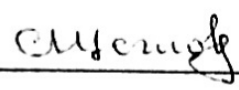
Направление 06.03.01 Биология

Научный руководитель

доцент, канд. биол. наук _____  3.05.18 _____ А. А. Самков
(подпись, дата)

Нормоконтролер

профессор, докт. биол. наук,

доцент _____  3.05.18 _____ С. Н. Щеглов
(подпись, дата)

Краснодар 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
1 Выделение и очистка ДНК для выявления специфических последовательностей.....	5
1.1 Выделение и очистка геномной ДНК бактерии.....	5
1.1.1 Метод фенол-хлороформной экстракции.....	6
1.1.2 Метод выделения нуклеиновых кислот на стекле.....	7
1.1.3 Метод на основе магнитной сепарации.....	8
1.2 Выделение и очистка плазмидной ДНК.....	8
1.2.1 Минипрепаративное выделение плазмидной ДНК (минипреп).....	9
1.2.2 Выделение плазмидной ДНК в больших объемах (максипреп).....	10
2 Определение концентрации ДНК в выделяемой смеси.....	12
3 Подбор праймеров.....	13
3.1 Работа с базами данных последовательностей генов.....	13
3.2 Правила подбора праймеров.....	14
3.3 Использование известных олигонуклеотидных последовательностей...	15
4 Основные методы ПЦР.....	18
4.1 Классическая ПЦР с электрофоретическим окончанием.....	18
4.1.1 Состав смеси для проведения ПЦР.....	19
4.1.2 Виды полимераз.....	19
4.1.3 Температурные режимы ПЦР.....	20
4.2 qRT-ПЦР.....	21
4.2.1 Особенности оборудования.....	22
4.2.2 Зонды в qRT-ПЦР.....	22
4.3 rt-ПЦР.....	23
5 Анализ сиквенса ампликонов.....	24
5.1 Секвенирование.....	24
5.2 ПДРФ-анализ.....	26
5.3 Сравнение ампликонов при помощи ДГГЭ.....	27
Заключение.....	29
Список использованных источников.....	30

ВВЕДЕНИЕ

Исследование бактерий, их идентификацию и анализ биотехнологически важных признаков можно проводить на основе фенотипических критериев. К ним относятся культуральные, морфологические, тинкториальные, физиологические и биохимические. Культуральные признаки – особенности роста микроорганизмов на плотной и жидкой питательной среде. К морфологическим признакам можно отнести размеры и форму клеток, их взаимное расположение, наличие или отсутствие капсулы, тип жгутикования, способность образовывать споры и т.д. Тинкториальные признаки – свойство микроорганизмов окрашиваться определенными красителями, например, окраска по Граму. Физиологические признаки – отношение к температуре, засоленности и кислотности среды, тип энергетических процессов, возможность использовать азот или углерод из различных источников и др. Биохимические признаки включают в себя наличие или отсутствие какого-либо фермента, химический состав клеток, образование специфичных продуктов обмена. Но данные критерии не могут дать представление о филогенетических связях между организмами, не всегда можно точно идентифицировать бактерии, а также исследование некоторых из вышеперечисленных признаков является трудоемким и занимает большое количество времени [Лысак, 2007].

Успехи в области генетики микроорганизмов – доказательство роли ДНК в хранении и передаче наследственной информации, расшифровка генетического кода, механизма репликации ДНК и синтеза белка – обусловили развитие молекулярной генетики. Развитие новейших технологий приводит к тому, что молекулярно-генетические методы анализа начинают занимать все большее место в изучении микроорганизмов. Молекулярно-генетические методы основаны на анализе нуклеиновых кислот. Данные методы позволяют идентифицировать бактерии и некультивируемые виды микроорганизмов, провести оценку степени активности гена, расшифровать последовательность нуклеотидов в генетическом материале, идентифицировать мутации в опреде-

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Аукунов Н. Е., Масабаева М. Р., Хасанова У. У. Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе // Наука и здравоохранение. 2014. № 1. С. 51-53.
- 2 Великов В. А. Молекулярная биология. Практическое руководство. Саратов, 2013. 84 с.
- 3 Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М., 2002. 589 с.
- 4 Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. СПб., 1997. 287 с.
- 5 Зорина В. В. Основы полимеразной цепной реакции. М., 2016. 76 с.
- 6 Использование биоинформационных методов при конструировании праймеров конститутивного гена, кодирующего белок тубулин для проведения ОТ-ПЦР / А. А. Адиева, Г. Р. Израилова, Р. А. Халилов, М. Г. Меджидова, Ю. А. Умарова // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 6. С. [1-8].
- 7 Использование технологии ПЦР в реальном времени для оценки эффективности методов выделения ДНК из культур ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов / С. В. Рогатых, А. А. Докшукина, Т. С. Хайнасова, С. В. Муратов, И. А. Кофиади // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47, № 2. С. 226-230.
- 8 Кардымон О.Л., Кудрявцева А.В. Молекулярно-генетические методы для исследования микробиома кишечника // Росс. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. 2016. № 26. С. 4-13.
- 9 Каюмов А.Р. Молекулярный анализ генома. Учебно-методическое пособие. Казань, 2016. 60 с.
- 10 Каюмов А. Р., Гимадутдинов О. А. Практикум по молекулярной генетике. Учебно-методическое пособие. Казань, 2016. 36 с.
- 11 Ковтун И. С., Ефимова М. В. Особенности подбора праймеров кон-

ститутивного гена для проведения полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 2. С. 160–171.

12 Кони́чев А. С., Севастьянова Г. А. Молекулярная биология. М., 2005. 400 с.

13 Лысак В.В. Микробиология. Минск. 2007. 426 с.

14 Лысенко Е.А. Полимеразная цепная реакция. Стратегия подбора праймеров для анализа экспрессии генов // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии. М., 2012. С. 75-95.

15 Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук, Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984. 480 с.

16 Основные аспекты конструирования праймеров для определения видовой принадлежности ДНК крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции / О. В. Кригер, Л. С. Солдатова, А. Ю. Кравченко, М. В. Новоселова // Современные проблемы науки и образования. Кемерово, 2012. С. [1-8].

17 Оценка комплекса микробиологических и молекулярно-генетических методов исследований для диагностики туберкулеза / Э. В. Севастьянова, В. А. Пузанов, Т. Г. Смирнова, Е. Е. Ларионова, Л. Н. Черноусова // Туберкулез и болезни легких. 2015. № 1. С. 35-41.

18 Полимеразная цепная реакция – современный метод клинической лабораторной диагностики / С. А. Костюк, Г. Я. Хулуп, Н. А. Бадыгина, Э. Н. Заборонок, Д. И. Страздин // Медицинские новости. 2004. № 2. С. 24-30.

19 Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) / Я. И. Алексеев [и др.] // Научное приборостроение. 2006. Т. 16, № 3. С. 132–136.

20 Розанов А. С., Загребельный С. Н., Беклемишев А. Б. Клонирование гена ксилулозо(глюкозо)изомеразы *Escherichia coli* K12 и изучение энзиматических свойств продукта его экспрессии // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Том 4, № 1. С. 38-44.

21 Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в ре-

жиге реального времени / С. М. Бикбулатова, Д. А. Чемерис, Ю. М. Никоноров, О. И. Машков, Р. Р. Гарафутдинов, А. В. Чемерис, В. А. Вахитов // Вестник Башкирского университета. Раздел: Биология. 2012. Т. 17, № 1. С. 59-67.

22 Шевченко О.В., Эйдельштейн М.В., Степанова М.Н. Металло-β-лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. 2007. Т. 9, № 3. С. 211-218.

23 Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор) / О. С. Антонова, Н. А. Корнева, Ю. В. Белов, В. Е. Курочкин // Научное приборостроение. 2010. Т. 20, № 1. С. 3–9.

24 Bano N., Hollibaugh J. T. Phylogenetic Composition of Bacterioplankton Assemblages from the Arctic Ocean // Applied and Environmental Microbiology. 2002. Vol. 68, № 2. P. 505-518.

25 Behavior of Variable V3 Region from 16S rDNA of Lactic Acid Bacteria in Denaturing Gradient Gel Electrophoresis / D. Ercolini, G. Moschetti, G. Blaiotta, S. Coppola // Current Microbiology. 2001. Vol. 42. P. 199-202.

26 Cline J., Braman J. C., Hogrefe H. H. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases // Nucleic Acids Research. 1996. Vol. 24, № 18. P. 3546–3551.

27 Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food // Journal of Microbiological Methods. 2004. № 56. P. 297-314.

28 Marmur J. A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms // J. Mol. Biol. 1961. № 3, P. 208-218.

29 Muyzer G., Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology // Antonie van Leeuwenhoek. 1998. № 73. P. 127-141.

30 O'sullivan D. J., Klaenhammer T. R. Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus spp.* // Applied and Environmental Microbiology. 1993. Vol. 59, № 8. P. 2730-2733.

31 Quantitative real-time RT-PCR – a perspective / S. A. Bustin, V. Benes,

- T. Nolan, M. W. Pfaffl // Journal of Molecular Endocrinology. 2005. № 34. P. 597-601.
- 32 Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids / R. Boom, C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-van Dillen, and J. van der Noordaa // Journal of Clinical Microbiology. 1990. Vol. 28, № 3. P. 495-503.
- 33 Ronaghi M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing // Genome Research. 2001. №11. P. 3-11.
- 34 Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74, № 12. P. 5463-5467.
- 35 Specific PCR Primers Directed To Identify cryI and cryIII Genes within a *Bacillus thuringiensis* Strain Collection / J. Ceron, A. Ortiz, R. Quintero, L. Guereca, A. Bravo // Applied and Environmental Microbiology. 1995. Vol. 61, № 11. P. 3826-3831.
- 36 Terpe K. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. P. [1-12].
- 37 Waleed Abu Al-Soud, Rådström P. Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples // Applied and Environmental Microbiology. 1998. Vol. 64, № 10. P. 3748-3753.