

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК**  
**ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД им. И.Д. ПАПАНИНА РАН**  
**УЧЕБНО-НАУЧНЫЙ ЦЕНТР**



**Н.Л. Белькова, А.М. Андреева**

**ВВЕДЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНУЮ ЭКОЛОГИЮ**  
**МИКРООРГАНИЗМОВ**

*УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ*

**Борок 2009**

УДК 579.26+577.2

ББК 28.4

Б43

Ответственный редактор: доктор биологических наук А.И. Копылов

Рецензенты: доктор биологических наук В.В. Алешин

доктор биологических наук Л.С. Бузолева

кандидат биологических наук М.С. Юркова

**Белькова Н.Л., Андреева А.М.** Введение в молекулярную экологию микроорганизмов: Учебно-методическое пособие. – Ярославль: Изд-во ООО «Принтхаус», 2009. – 91 с.

ISBN 978-5-904234-06-5

В настоящем пособии в доступной форме изложены теоретические основы генной инженерии и дано подробное описание этапов экспериментальной работы по изучению генетического разнообразия микробных сообществ. Пособие рассчитано на студентов, аспирантов и специалистов, интересующихся проблемами молекулярной экологии микроорганизмов.

Библиограф. 74 назв. Ил. 10. Табл. 7.

УДК 579.26+577.2

ББК 28.4

ISBN 978-5-904234-06-5

© Белькова Н.Л., Андреева А.М., 2009  
© Учреждение Российской Академии наук  
Институт биологии внутренних вод  
им. И.Д. Папанина РАН, 2009

## СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие.....	5
Введение в молекулярную экологию микроорганизмов.....	6
Список сокращений.....	8

### I. Теоретический раздел

Глава 1. Генная инженерия .....	9
1.1. Введение понятий.....	9
1.2. Ферменты, используемые в генной инженерии.....	12
1.3. Современная стратегия генной инженерии.....	19
1.4. Клонирование векторов.....	20
1.5. Использование бактерий для генно-инженерных исследований.....	22
Глава 2. Теоретические основы полимеразной цепной реакции... ..	25
2.1. Основные термины и понятия.....	25
2.2. Принцип метода ПЦР.....	25
Глава 3. Теория клонирования генов.....	30
3.1. Введение основных понятий.....	30
3.2. Клонирование генов в клетках <i>E.coli</i> .....	31
3.3. Прямая селекция клонов, содержащих плазмиду со вставкой ПЦР-продукта.....	35

### II. Использование молекулярно-биологических методов в молекулярной экологии микроорганизмов

Глава 4. Молекулярно-биологические методы в изучении состава микробных сообществ.....	37
---	----

### III. Методический раздел

Общая схема основных этапов практической работы по изучению генетического разнообразия микроорганизмов из микробных сообществ.....	52
--	----

Глава 5. Требования к проведению пробоотбора и фиксации бактериального материала .....	54
Глава 6. Выделение суммарной бактериальной ДНК .....	56
6.1. Выделение ДНК методом ферментативного лизиса .....	61
6.2. Метод очистки ДНК с применением ЦТАБ.....	62
6.3. Выделение ДНК с помощью сорбентов.....	63
Глава 7. Амплификация фрагмента гена 16S рРНК из суммарной бактериальной ДНК.....	66
7.1. Подбор пары праймеров.....	67
7.2. Подбор оптимальных условий амплификации.....	68
7.3. Очистка ПЦР-продукта.....	70
Глава 8. Лигирование ПЦР-продукта в плазмидные вектора.....	73
8.1. Лигирование ПЦР-продуктов с липкими концами.....	73
8.2. Лигирование ПЦР-продуктов с тупыми концами.....	74
Глава 9. Трансформация клеток <i>E.coli</i> .....	75
9.1. Приготовление компетентных клеток.....	75
9.2. Тепловой шок и собственно трансформация .....	77
9.3. Прямая селекция клонов, содержащих вставку ПЦР- продукта.....	78
Глава 10. Выделение плазмидной ДНК.....	79
Глава 11. Подготовка препаратов ПЦР-продуктов к секвенированию.....	81
Глава 12. Сравнительный и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей.....	81
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	83

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Данное методическое пособие издается по инициативе Центра коллективного пользования «Молекулярные технологии» ИБВВ РАН для студентов, аспирантов и сотрудников, интересующихся проблемами молекулярной экологии микробных сообществ, а также для всех желающих ознакомиться с принципами и методами генной инженерии.

В предлагаемом сборнике в доступной форме изложены основные положения генной инженерии, за которыми следует подробный методический раздел. Такой способ изложения материала значительно облегчает задачу обучения сотрудников, не имеющих возможности прослушать специализированный курс лекций по генной инженерии в полном объеме и не имеющих навыков работы с ДНК. В методическом разделе порядок изложения методов соответствует последовательности этапов практической работы с микробными сообществами: пробоотбор, первичная обработка бактериального материала, выделение тотальной ДНК, амплификация фрагмента гена 16S рРНК, введение его в плазмиду, трансформация плазмид в компетентные клетки *E.coli*, скрининг рекомбинантов и выделение анализируемых фрагментов из плазмид. Последующие этапы анализа - секвенирование, сравнительный и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов анализируемых генов – описаны в коротких ознакомительных главах.

Пособие является основным практическим руководством для организованных на базе Центра ежегодных школ для молодых ученых по молекулярной экологии микробных сообществ, задачей которых является обучение студентов старших курсов университетов, аспирантов и научных сотрудников навыкам экспериментальной работы с ДНК.

Зав.ЦКП «Молекулярные технологии»

д.б.н. А.М. Андреева

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **в молекулярную экологию микроорганизмов**

Необходимость написания данного пособия связана с быстрым развитием методов молекулярной биологии и широкими возможностями их применения для изучения разнообразия и функционирования различных микробных сообществ. Молекулярно-генетические методы в настоящее время становятся одной из необходимых составляющих в комплексных исследованиях экологии микроорганизмов. На основании сравнительного и филогенетического анализа последовательностей рибосомных генов проводится генетическая идентификация микроорганизмов, составляющих микробное сообщество, включая разнообразие некультивируемых видов. Широкое применение молекулярно-генетического подхода к изучению экологии микроорганизмов основано на возможности исследовать именно те бактериальные виды и группы, культивирование которых по тем или иным причинам затруднительно. Современное направление изучения микробных сообществ – молекулярная экология микроорганизмов - возникло благодаря удачному сочетанию двух методических открытий конца XX века: полимеразной цепной реакции и концепции генно-инженерных исследований. Сложность освоения основных методов и подходов, применяемых молекулярными экологами, успешно компенсируется широким набором характеристик, позволяющих более полно, по сравнению с классическим микробиологическим подходом, исследовать природное микробное сообщество, включая анализ некультивируемых микроорганизмов. Поэтому, дополняя данные, полученные прямым подсчетом общей численности бактерий и культивированием на питательных средах определенных групп микроорганизмов, результатами молекулярно-генетических исследований, мы получаем комплексный анализ микробных сообществ. С использованием именно такого методического подхода был

выявлен высокий уровень разнообразия микроорганизмов, имеющих низкую общую численность, в глубоководных микробных сообществах озера Байкал, характеризующегося олиготрофными условиями (Белькова и др., 1996; Белькова и др., 2003; Белькова, 2004).

В предлагаемом пособии собраны воедино классические методы генетической инженерии (Маниатис и др., 1984; Sambrook et al., 1989; и др.) и некоторые справочные данные, дано четкое определение молекулярно-генетических терминов; кроме того, в пособии представлены оригинальные методические подходы, разработанные в многолетних экспериментальных исследованиях и апробированные при изучении различных природных микробных сообществ из пресноводных, морских и гидротермальных источников, из бактериальных матов и микроорганизменных ассоциаций с высшими животными и растениями (Белькова и др., 2005; Лаптева и др., 2007; Белькова и др., 2008*a*, 2008*б*; Рыбакова и др., 2009).

к.б.н., доцент Н.Л. Белькова

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

БФС – бромфеноловый синий

ддНТФ – дидезоксинуклеотидтрифосфаты

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфаты

ДФПН - дифосфопиридиннуклеотид

ед. акт. – единицы активности

кДа – килодальтоны

*мин, сек, мс* – минуты, секунды, миллисекунды

ММ – молекулярная масса

ПААГ – полиакриламидный гель

п.н., т.п.н. – пара нуклеотидов, тысячи пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

ТСБ – трис-солевой буфер

ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

К-MES – 2[N-морфолино]этансульфонат калия

$\beta$ -ME –  $\beta$ -меркаптоэтанол

SAM – S-аденозинмонофосфат

SDS – додецилсульфат натрия



# І. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

## ГЛАВА 1

### ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

#### 1.1. Введение понятий

*Генная инженерия* – это новая экспериментальная технология, занимающаяся разработкой и совершенствованием методов анализа и манипулирования ДНК. Эта технология открывает широкие возможности для конструирования *in vitro* искусственных генетических систем, в которых могут быть объединены гены или фрагменты генов из организмов разных видов. С ее помощью можно вводить рекомбинантную ДНК в живые клетки, получать клеточные клоны с рекомбинантными ДНК и использовать их в фундаментальных исследованиях и практических технологиях. Уже в настоящее время с помощью генной инженерии получены трансгенные животные и растения, несущие в себе гены разных видов организмов и обладающие полезными селективируемыми признаками: новые сельскохозяйственные культуры, имеющие высокую морозоустойчивость, устойчивость к вредителям, инфекциям и гербицидам; рекомбинантные микроорганизмы, обеспечивающие получение сыров и вин в пищевой промышленности; а также новые технологии получения тканей, бумаги, лекарственных препаратов, технологии очистки окружающей среды от токсичных соединений, добычи полезных ископаемых (Патрушев, 2004).

*ДНК как объект генной инженерии.* Главным объектом генно-инженерных исследований является молекула ДНК (рис.1). ДНК, или дезоксирибонуклеиновая кислота, – это полимер, состоящий из линейно расположенных субъединиц – нуклеотидов. Нуклеотид содержит три компонента: пуриновое или пиримидиновое основание, пятиуглеродный циклический сахар дезоксирибозу, с которым основание связано одним из

своих атомов азота N-гликозидной связью, и фосфат, связанный эфирной связью с 5'-углеродом сахара. Тип нуклеотида определяется азотистым основанием. В ДНК имеется четыре разных основания: аденин, тимин, гуанин и цитозин, которые условно обозначают как А, Т, G и С, соответственно. Нуклеотиды соединяются друг с другом в полимерную цепочку с помощью фосфодиэфирных связей. Азотистые основания не принимают участия в соединении нуклеотидов одной цепи. Углеводно-фосфатный остов имеет регулярную структуру, а последовательность пуриновых и пиримидиновых оснований – нерегулярна.

Молекула ДНК состоит из двух полимерных цепей, закрученных в спираль (рис. 1).

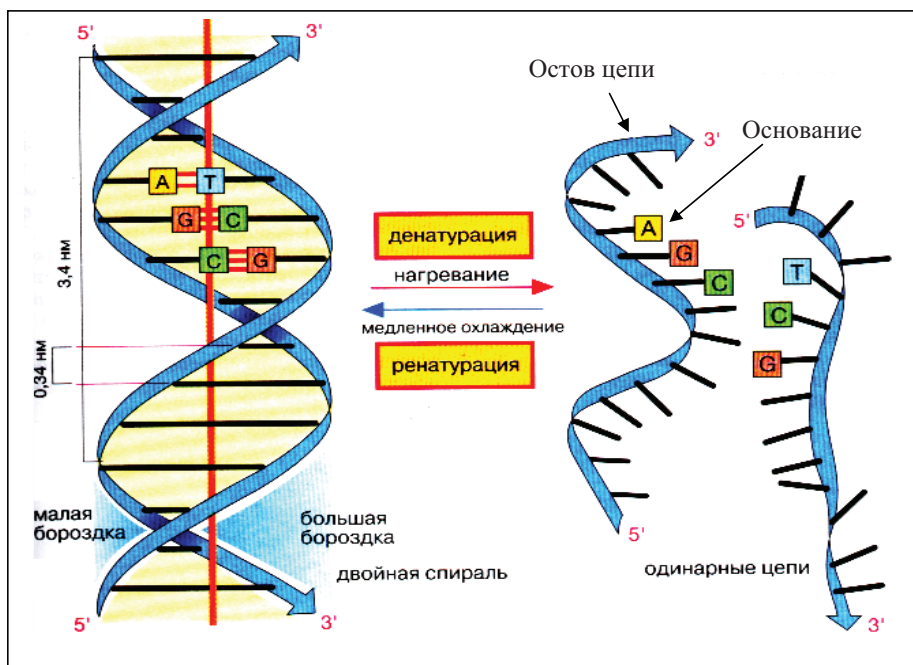


Рис.1. Структура ДНК (Кольман, Рем, 2004).

Пуриновые и пиримидиновые основания цепей обращены внутрь двойной спирали и расположены параллельно друг другу и перпендикулярно оси спирали. Спираль ДНК стабилизирована водородными связями между парами оснований: А и Т, G и C, специфичность спаривания которых обуславливает комплементарность последовательности оснований в обеих цепях ДНК. В такой молекуле ДНК отдельные цепи ориентированы противоположно (антипараллельно), но обе от 5'-конца к 3'-концу.

Важным свойством ДНК является то, что 3', 5'-фосфодиэфирная связь углеродно-фосфатного остова молекулы чувствительна как к химическому, так и ферментативному расщеплению.

Большое значение для функционирования ДНК в процессах репликации и транскрипции имеет возможность легкого расхождения цепей при некоторых воздействиях и их последующего воссоединения. Когда водородные связи между основаниями разрываются, то в результате цепи, образующие двухцепочечную молекулу ДНК, расходятся – денатурируют (рис.1).

Денатурация, или плавление ДНК, происходит при увеличении температуры раствора и в сильно щелочной среде. Стабильность двухцепочечной ДНК напрямую зависит от количества GC-пар, так как GC-пары связаны тремя водородными связями, в то время как AT-пары соединены двумя водородными связями. Чем выше содержание GC-пар, тем выше температура плавления ДНК.

Денатурация обратима даже после полного разделения двух цепей. Если инкубировать комплементарные цепи при температуре примерно на 25<sup>0</sup>C ниже температуры плавления исходной ДНК, то они начинают реассоциировать. Этот процесс называется ренатурацией или отжигом (рис. 1). Ренатурация ДНК осуществляется в 2 этапа: сначала в результате случайных столкновений одноцепочечных молекул происходит правильное соединение коротких комплементарных участков. После образования таких

двухцепочечных структур идет быстрое «схлопывание» по всей длине и восстановление исходной двухцепочечной спиральной молекулы ДНК.

## 1.2. Ферменты, используемые в генной инженерии

Осуществить разнообразные методологические походы в генно-инженерных исследованиях удалось только после того, как были найдены и выделены ферменты, катализирующие реакции с нуклеиновыми кислотами. Наиболее важными и широко используемыми ферментами в генной инженерии являются эндонуклеазы рестрикции. В данном разделе, кроме рестриктаз, будут рассмотрены также ферменты ДНК-лигазы и ДНК-полимеразы. Сводка по перечисленным ферментам составлена на основе сведений из соответствующих глав монографий Т. Маниатиса (Маниатис и др., 1984), Л.И. Патрушева (Патрушев, 2004) и С.Н. Щелкунова (Щелкунов, 2004).

### *Рестриктазы*

Рестриктазы, или эндонуклеазы рестрикции, расщепляют ДНК по определенным олигонуклеотидным последовательностям. Эти белки были открыты при изучении фагов в бактериях, например, при изучении бактериофага лямбда  $\lambda$ , природным хозяином которого является кишечная палочка *Escherichia coli*. Рестриктазы участвуют как в рестрикции, так и в модификации ДНК (система рестрикции - модификации R-M). Модификация заключается в метилировании определенных оснований в последовательности, которую узнает рестриктаза, и это обстоятельство защищает данный участок ДНК от действия рестриктазы. По ряду особенностей структурно-функциональной организации эти ферменты подразделяют на три класса.

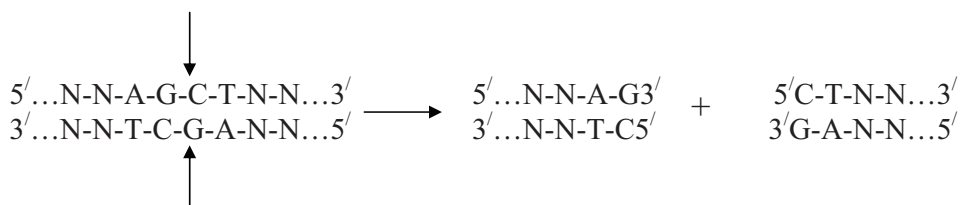
Рестриктазы I класса представлены белками с ММ от 400 до 600 кДа, состоящими из трех субъединиц разного типа (эндонуклеаза, метилаза и

фермент узнавания). Наиболее изучены ферменты *EcoK* и *EcoV*, выделенные соответственно из клеток штаммов *E.coli* K12 и *E.coli* В. Они содержат по три субъединицы ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ) с ММ 135, 60 и 50 кДа, соотношение которых в ферменте различно. Ферменты узнают строго специфические последовательности ДНК, однако, разрывают ДНК случайным образом на расстоянии 400–700 п.н. от участка узнавания; в качестве кофакторов они используют АТФ, SAM, ионы  $Mg^{2+}$ . Расщепление ДНК совмещено с гидролизом АТФ.

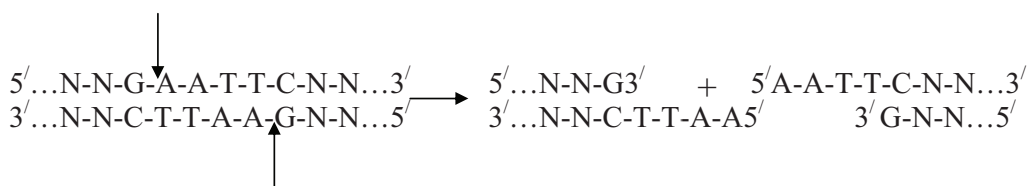
Рестриктазы II класса состоят из отдельных белков: рестрикционной эндонуклеазы и модификационной метилазы; каждый из белков можно выделить в индивидуальном состоянии. Рестриктазы имеют ММ 50–100 кДа, состоят из двух субъединиц одного типа; узнают и разрезают немодифицированную двухцепочечную молекулу ДНК по специфичным последовательностям, что приводит к образованию дискретного набора ДНК-фрагментов. Для их специфического действия требуются только ионы  $Mg^{2+}$  в физиологических концентрациях. Рестриктазы узнают последовательности длиной 4–8 п.н. двухцепочечной ДНК с осью симметрии II порядка – палиндромы.

*Палиндром* – это участок двухцепочечной молекулы ДНК, обе цепи которого обладают одинаковой последовательностью нуклеотидов при прочтении от 5' к 3' и от 3' к 5' концу, то есть является тандемным инвертированным повтором.

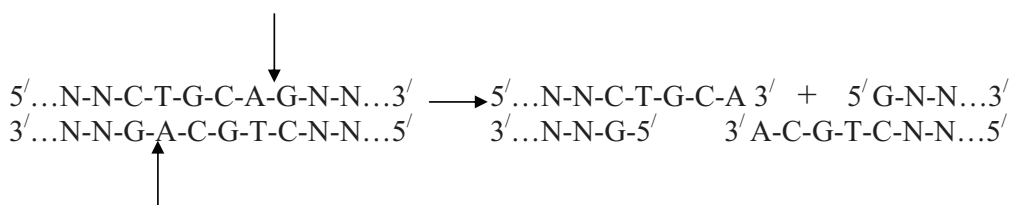
Одни рестриктазы (*AluI*) расщепляют ДНК строго по оси симметрии узнаваемой последовательности, что приводит к образованию фрагментов ДНК с *тупыми концами*, не имеющими выступающих одноцепочечных участков:



Другие рестриктазы (*EcoRI*) расщепляют узнаваемую последовательность с образованием одноцепочечных *липких концов*:



Кроме выступающих липких 5'-концов рестриктазы могут образовывать также липкие 3'-концы (рестриктаза *PstI*):



подавляющее число рестриктаз класса II используют в качестве субстрата немодифицированную ДНК. Однако встречаются рестриктазы, расщепляющие *in vitro* только метилированные последовательности ДНК.

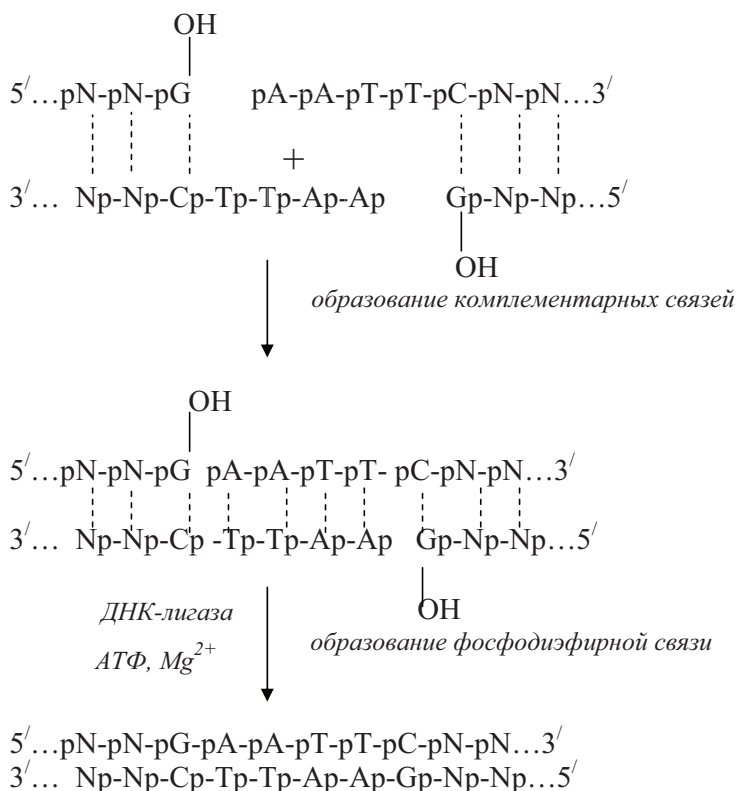
Рестриктазы III класса похожи на рестриктазы I класса. Фермент имеет ММ 200-300 кДа, состоит из двух различных субъединиц и обладает рестриктазной и метилазной активностью. Узнает несимметричные последовательности длиной 5–6 п.н. и расщепляют ДНК на расстоянии 24–27 п.н. от участков узнавания, образуя одноцепочечные 5'-концы длиной в 2–3 нуклеотида. Для проявления эндонуклеазной активности требуется АТФ и  $\text{Mg}^{2+}$ . SAM лишь стимулирует реакцию, а расщепление не сопровождается гидролизом АТФ.

## *ДНК-лигазы*

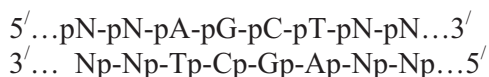
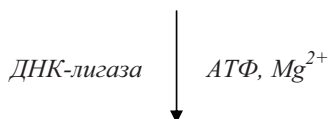
В отличие от рестриктаз, «разрезающих» ДНК, лигазы «сшивают» фрагменты ДНК. Описаны два типа ДНК-лигаз: фермент, синтезируемый в клетках *E.coli*, и фермент, появляющийся в клетках *E.coli*, инфицированных фагом Т4. Эти лигазы различаются по потребностям в кофакторах: ДНК-лигаза *E.coli* нуждается в ДФПН, а ДНК-лигаза фага Т4 - в АТФ. Кроме того, фермент второго типа в отличие от первого способен катализировать воссоединение двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами.

ДНК-лигаза фага Т4 - мономерный белок с ММ 68 кДа, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатным (5'-р) и 3'-гидроксильным (3'-ОН) концами цепей ДНК. Возможны 2 типа реакций:

### 1. Лигирование липких концов:



## 2. Лигирование тупых концов:



Таким образом, ДНК-лигаза фага Т4 обеспечивает ковалентное соединение любых двухцепочечных фрагментов ДНК за счет «сшивки» 5'-р и 3'-ОН концов. Спектр продуктов лигазной реакции зависит от концентрации участвующих в ней фрагментов ДНК. При высокой концентрации преимущественно образуются длинные линейные молекулы ДНК. По мере снижения концентрации фрагментов повышается вероятность образования кольцевых структур ДНК. Гибридные молекулы с наибольшей частотой будут состоять из двух фрагментов, реже из трех и более. Если же препарат развести до определенной концентрации, то преимущественно будут образовываться кольца из отдельных фрагментов. Поэтому так важно тщательно выбрать условия лигазной реакции, при которых происходит образование гибридных молекул, состоящих из двух фрагментов ДНК.

### *ДНК-полимеразы*

К ДНК-полимеразам относятся ферменты, способные использовать полинуклеотиды как матрицы и строить комплементарные им новые нуклеотидные цепи.



ДНК-полимераза I *E.coli*. Этот фермент является первой обнаруженной полимеразой. Это мономерный белок с ММ 103 кДа, имеющий трехдоменную структуру. Каждый домен белка проявляет отдельную ферментативную активность: N-концевой домен – 5'-3'-экзонуклеазную, С-концевой домен – 5'-3'-полимеразную, средний домен – 3'-5'-экзонуклеазную. ДНК-полимераза I *E.coli* (PolI) не связывается с молекулами двухцепочечной кольцевой ДНК. Однако если ДНК денатурировать и получить одноцепочечные формы, то с ними полимераза связывается в количествах, пропорциональных длине этих участков – примерно 1 молекула на 300 нуклеотидных остатков. PolI связывается с одноцепочечными участками двойной спирали ДНК, в местах одноцепочечных разрывов, а также с концами двухцепочечных молекул ДНК.

5'-3'- полимеразная активность фермента реализуется при наличии одноцепочечной ДНК-матрицы и комплементарного участку этой цепи фрагмента – праймера (затравки) с 3'-ОН-концом. Однако при полимеразной реакции возможно включение в растущую цепь некомплементарного нуклеотида. Тогда на помощь приходит 3'-5'-экзонуклеаза, убирающая ошибочный нуклеотид, на место которого затем присоединяется правильный.

3'-5'- экзонуклеазная активность проявляется в направлении, обратном синтезу ДНК. Расщепление фосфодиэфирной связи происходит в неспаренных участках двухцепочечной молекулы ДНК. 3'-5'-нуклеаза способна отщеплять одномоментно только 1 нуклеотид. Именно эта активность обеспечивает точность полимеризации, направляемой матрицей.

5'-3'- экзонуклеазная активность фермента деградирует одну цепь двухцепочечной ДНК, начиная со свободного 5'-конца, расщепляет фосфодиэфирную связь только в спаренных участках двухцепочечной молекулы ДНК, может вырезать с 5'-конца олигонуклеотиды длиной до 10 остатков.

Таким образом, PolII после связывания с двухцепочечной ДНК в месте одноцепочечного разрыва в присутствии дНТФ катализирует одновременно две реакции – 5'-3'-гидролиз разорванной цепи молекулы ДНК и 5'-3'-полимеразную реакцию, а 3'-5'-экзонуклеаза устраняет возникающие в процессе работы фермента ошибки.

При ограниченном протеолизе фермента PolII протеазами он распадается на два фрагмента, имеющих размер 35 и 68 кДа. Большой – бифункциональный фрагмент принято называть фрагментом Клёнова ДНК-полимеразы I *E.coli*, он обладает 5'-3'-полимеразной и 3'-5'-экзонуклеазной активностями. Его используют для достройки одноцепочечных 5'-выступающих концов на двухцепочечной ДНК до тупых, для синтеза второй цепи на одноцепочечной ДНК, для гидролиза выступающих одноцепочечных 3'-концов на двухцепочечных молекулах ДНК.

Термостабильные ДНК-полимеразы. Первой была выделена и охарактеризована ДНК-полимераза из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* (*Taq* ДНК-полимераза). Термофильная бактерия *Thermus aquaticus* живет в горячих источниках. Фермент *Taq* ДНК-полимераза, выделенная из этой бактерии, представляет собой мономерный белок с ММ 94 кДа, обладающий 5'-3'-полимеразной и 5'-3'-экзонуклеазной активностью. Важным свойством фермента является его термостабильность: он не инактивируется после длительной инкубации при 95<sup>0</sup>С. Оптимальная температура синтеза новой цепи (элонгации) по матричной составляет 72<sup>0</sup>С, а скорость работы фермента составляет 1000 п.н. за 1 мин. Однако 3'-5'-экзонуклеазная активность, позволяющая исправлять ошибки фермента и корректировать неправильно встроенные в цепь нуклеотиды, у *Taq* ДНК-полимеразы ослаблена или не проявляется вовсе. Так, в среднем, на каждые 10 000 или 100 000 нуклеотидов присоединяется один некомплементарный, а за 20-25 циклов накапливается заметное число ошибок относительно исходной матрицы, которое может достигать до одного нуклеотида на 400.

В начале 1990-х годов появилась целая серия рекомбинантных ферментов, выделенных из некоторых термофильных архей, которые сохраняли 3'-5'-экзонуклеазную корректирующую активность. К последним относятся *Pfu* и *Vent*, *Deer Vent* ДНК-полимеразы, выделенные из *Pyrococcus furiosus* и *Thermococcus litoralis*, соответственно. Однако, обладая более высокой точностью, эти ферменты неспецифически гидролизуют праймеры, поэтому требуют дополнительных экспериментов по подбору оптимальных условий проведения амплификации. Несомненно, что *Taq* ДНК-полимераза в настоящее время остается наиболее удобным и самым широко используемым ферментом для проведения полимеразной цепной реакции.

### 1.3. Современная стратегия генной инженерии

Годом рождения генетической инженерии считают 1972 год. Именно в этом году в Стэнфордском университете (США) в лаборатории Пола Берга была получена первая рекомбинантная или гибридная ДНК (рекДНК). Она соединяла в себе фрагменты ДНК фага  $\lambda$ , кишечной палочки и обезьяньего вируса SV40. Затем разрозненные методологические подходы были объединены в единую современную стратегию генетической инженерии, суть которой заключается в следующем:

1. в небольшую молекулу ДНК плазмиды или вирусную ДНК, способную реплицироваться в клетке автономно от хромосомы, ферментативно встраивают фрагменты молекул ДНК любого изучаемого организма или искусственно синтезируемые сегменты ДНК;

2. образующиеся при этом молекулы (гибридные ДНК) вводят в чувствительные прокариотические или эукариотические клетки, где они реплицируются, размножая встроенные фрагменты ДНК;

3. определенными методами отбирают клоны клеток или вирусов, содержащих индивидуальные типы молекул гибридной ДНК;

4. выявленные гибридные ДНК подвергают разностороннему структурно-функциональному изучению, особую роль при этом играют высокоэффективные методы расшифровки последовательности нуклеотидов (секвенирование) фрагментов ДНК.

#### 1.4. Клонирование векторов

При осуществлении рекомбинации *in vitro* один из фрагментов ДНК содержит информацию, необходимую для автономной репликации гибридной молекулы в определенном типе клеток. При выделении чистой культуры из колонии, выросшей из единичной клетки, которая содержит индивидуальную молекулу гибридной ДНК, осуществляется клонирование определенного фрагмента ДНК.

Фрагмент, обеспечивающий репликацию гибридной молекулы ДНК в клетке, называется клонирующим вектором и обладает следующими свойствами:

1. имеет ограниченное число мест узнавания рестриктазой определенного типа;
2. содержит один или несколько генетических маркеров, которые используют для отбора клонов, несущих гибридные ДНК, после введения в чувствительные клетки смеси молекул ДНК, полученных в процессе рекомбинации *in vitro*;
3. не должен терять репликативные функции после встройки экзогенного фрагмента ДНК.

**Векторы** – это самореплицирующиеся (автономные) молекулы ДНК, которые используют для переноса генов из организма-донора в организм-реципиент и для клонирования нуклеотидных последовательностей.

В качестве векторных молекул в генетической инженерии используют широкий спектр плазмидных и вирусных ДНК. Частным случаем

клонированных векторов являются экспрессирующие векторы. Это молекулярные векторы, которые наряду с амплификацией обеспечивают правильную и эффективную экспрессию чужеродных генов в клетках-реципиентах. В ряде случаев молекулярные векторы обеспечивают интеграцию чужеродной ДНК в геном клетки или вируса, такие векторы называют интегративными.

Векторные молекулы играют важнейшую роль на этапе клонирования изучаемых молекул ДНК. Использование таких структур позволяет получать анализируемый фрагмент в индивидуальном состоянии и в препаративных количествах. Это подняло на качественно новый уровень исследования структурно-функциональной организации геномов как прокариотических, так и эукариотических организмов.

Для клонирования фрагментов чужеродной ДНК и размножения их в клетках *E. coli* используют четыре типа векторов: бактериофаг  $\lambda$  и M13, космиды и плазмиды. При использовании генно-инженерных подходов для изучения генетического разнообразия микробных сообществ обычно используют клонирующие векторы, сконструированные на основе плазмид, так как они наиболее доступны и удобны для проводимых работ.

**Плазмиды** – это автономно реплицирующиеся внехромосомные генетические элементы, впервые обнаруженные в цитоплазме бактерий. Плазмиды представляют собой небольшие замкнутые кольцевые молекулы ДНК размером от 1 до 200 т.п.н. и более, находящиеся в клетках в сверхспирализованном состоянии.

Чтобы стать удобным вектором, плазида должна содержать единичный уникальный сайт для одного фермента рестрикции (или единичные сайты для нескольких рестриктирующих ферментов) в области, которая не существенна для репликации плазмиды. Оптимальным является нахождение сайтов рестрикции, по которым происходит встраивание фрагментов чужеродной ДНК, внутри генов, кодирующих маркеры, позволяющие проводить отбор

рекомбинантных плазмид. В этом случае вставка фрагмента чужеродной ДНК ведет к инаktivации этого гена, и признак не проявляется в колониях тех клеток, которые несут рекомбинантную плазмиду. К числу таких генов относятся гены, определяющие устойчивость к антибиотикам, способность к синтезу антибиотиков, расщепление сложных органических соединений, образование энтеротоксинов, образование ферментов рестрикции и модификации (Маниатис и др., 1984). В природе многие плазмиды передаются новым хозяевам посредством процесса, аналогичного конъюгации бактерий. В лаборатории же плазмиды можно передавать бактериям путем искусственного процесса, названного трансформацией.

### **1.5. Использование бактерий для генно-инженерных исследований**

Дэвид Кларк и Лонни Рассел назвали бактерии «подопытными кроликами» молекулярных биологов (Кларк, Рассел, 2004). Действительно, первые эксперименты, положившие начало современной молекулярной биологии, ставили на бактериях. Но особую известность среди них получила только одна - кишечная палочка или *Escherichia coli*. «*E.coli*, ее плазмиды и фаги явились первыми объектами генетической инженерии, на которых удалось достичь сенсационных результатов по клонированию и экспрессии чужеродных генов» (Щелкунов, 2004). В клетках *E.coli* были впервые обнаружены плазмиды, например, F-плазида (половой фактор в виде внехромосомной кольцевой двухцепочечной ДНК); разработаны способы введения различных фаговых и плазмидных ДНК в клетки; обнаружены транспозирующиеся элементы, выявлена их роль в интеграции F-плазмиды в бактериальную хромосому (Льюин, 1987).

*E.coli* используют в биотехнологиях для синтеза рекомбинантных белков (Патрушев, 2004), применяющихся для получения поликлональных антител (Steinberger et al., 2000), рекомбинантных одноцепочечных антител и их

фрагментов (Kramer, Hock, 2003), катехолдиоксигеназ для устранения хлорсодержащих загрязнений окружающей среды (Lecerf et al., 2001), разнообразных ферментов, меченых белков для ЯМР-спектроскопии (Ward et al., 1989), в производстве рекомбинантного инсулина, интерферона (Holt et al., 2003).

Для работы с бактериальными штаммами необходимо знать правила выращивания и хранения бактериальных штаммов.

Выращивание бактериальных штаммов. При оптимальных условиях культура *E.coli* растет экспоненциально. Скорость роста культуры зависит от состава питательной среды, pH питательной среды, генотипа штамма, температуры и аэрации. По мере увеличения плотности культуры скорость деления клеток снижается до тех пор, пока бактерии не достигнут такой концентрации (или насыщающей плотности), при которой они жизнеспособны, но уже не делятся.

За скоростью роста культуры удобнее следить, отбирая из культуральной жидкости через определенные промежутки времени пробы и измеряя их оптическую плотность  $D$  при длине волны 590–600 нм ( $D_{600} = 1$  соответствует примерно  $7-8 \times 10^8$  кл/мл). На кривой роста клеточной популяции различают несколько различных фаз роста: лаг-фазу, лог-фазу, стационарную фазу и фазу отмирания (рис. 2).

Построив кривую роста клеточной популяции, можно определить, через какое время культура достигнет логарифмической фазы роста. При выделении плазмидной ДНК и для получения компетентных клеток для трансформации очень важно использовать бактериальную культуру в конце лог-фазы.

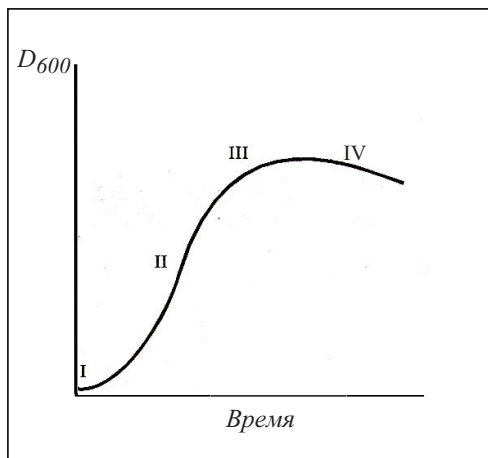


Рис. 2. Кривая роста бактериальной культуры: I – лаг-фаза, II – лог-фаза, III – стационарная фаза, IV – фаза отмирания.

*Л а г – ф а з а* – фаза адаптации клеток к среде, после чего клетки способны к делению.

*Л о г – ф а з а* – или экспоненциальная фаза, в начале этой фазы возрастает частота клеточного деления и нарастает количество клеток, затем наблюдается постоянная продолжительность существования возникающих друг за другом поколений клеток.

*С т а ц и о н а р н а я ф а з а* – характеризуется уменьшением скорости размножения в результате истощения питательной среды и накопления продуктов обмена.

*Ф а з а о т м и р а н и я* – на этой фазе начинается автолиз клеток.



## ГЛАВА 2

### ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

#### 2.1. Основные термины и понятия

В 1985 г. К. Маллис с сотрудниками разработали метод, который назвали полимеразной цепной реакцией (ПЦР, PCR), суть которого заключается в амплификации изучаемых фрагментов ДНК.

**Полимеразная цепная реакция** – это метод многократного воспроизводства выбранного фрагмента ДНК *in vitro*.

**Амплификация** – накопление копий фрагмента ДНК во время ПЦР.

Об эффективности технологии ПЦР можно судить по тому факту, что в течение нескольких часов *in vitro* можно выделить и размножить анализируемую нуклеотидную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходное в  $10^5$ . Высокая эффективность ПЦР обеспечивается использованием коротких ДНК-фрагментов – олигонуклеотидов, или ДНК-праймеров, которые фланкируют интересующую область ДНК и позволяют выборочно «множить» эту область.

**Праймеры** – это олигонуклеотиды, используемые в ПЦР для ограничения фрагмента ДНК и дальнейшей выборочной амплификации этого фрагмента.

#### 2.2. Принцип метода ПЦР

Для амплификации фрагмента любого гена необходимы следующие компоненты: матричная ДНК, четыре дНТФ, *Taq* ДНК-полимераза и два синтетических праймера длиной 15–30 нуклеотидов, комплементарных 3'-участкам антипараллельных цепей ДНК, фланкирующих фрагмент матрицы. Среда для амплификации ДНК-фрагментов, должна содержать одновалентные ионы (для поддержания нативного состояния фермента),

буфер (для поддержания оптимального рН для работы фермента) и строго определенную концентрацию кофактора (двухвалентных катионов, обычно  $Mg^{2+}$ ). ПЦР включает в себя повторяющиеся циклы температурной денатурации ДНК, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК и последующую достройку полинуклеотидных цепей праймеров ДНК-полимеразой. Праймеры подбираются таким образом, что их ориентация на обеих нитях исходной ДНК позволяет ДНК-полимеразе вести синтез ДНК только между ними, удваивая количество копий ДНК, заключенной между праймерами. На рис. 3 приведена схема ПЦР:

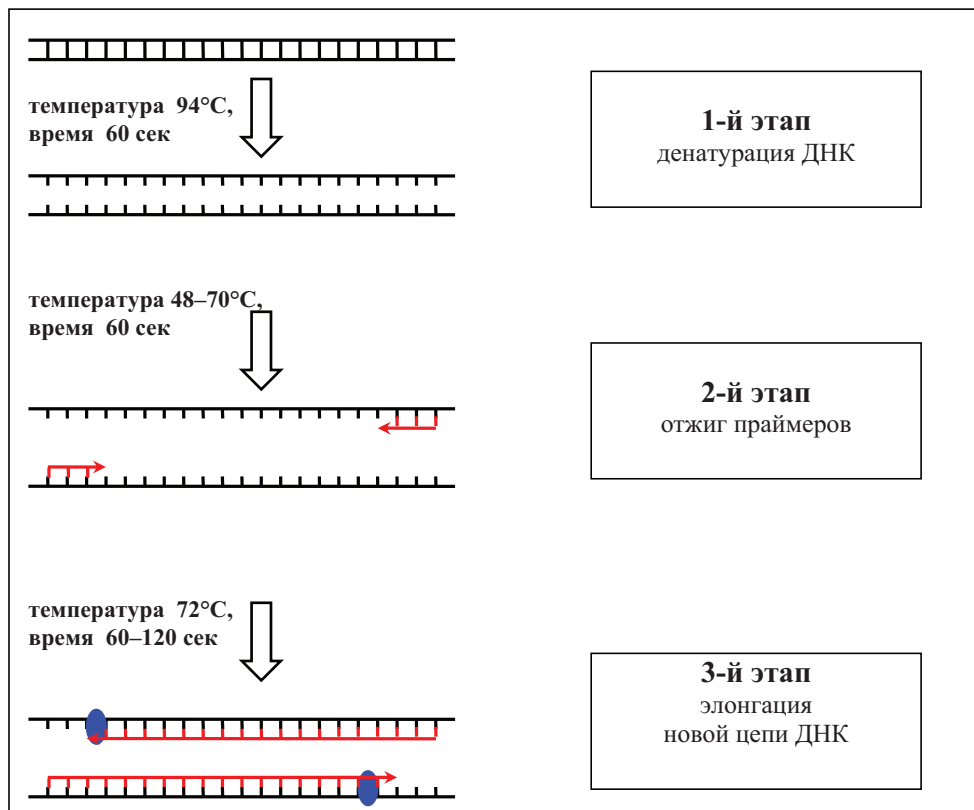


Рис. 3. Схема основных этапов полимеразной цепной реакции.

Рассмотрим более подробно основные этапы полимеразной цепной реакции. ПЦР начинается с кратковременного прогрева (1–2 мин) реакционной смеси при температуре 95<sup>0</sup>С, при которой происходит плавление цепей ДНК и получение однонитевой ДНК, играющей роль матрицы (рис. 3, 1-й этап).

При высокой температуре происходит инактивация примесных белков (при использовании недостаточно очищенной ДНК). Далее реакционную смесь охлаждают до 48–70<sup>0</sup>С, при этом происходит связывание (отжиг) праймеров с матричной ДНК (рис. 3, 2-й этап).

В результате праймеры связываются путем гибридизации с комплементарными местами на матрице и с этого момента начинают служить затравками для синтеза *Taq* ДНК-полимеразой новых цепей ДНК, комплементарных каждой из цепей денатурированной матричной ДНК. Комплементарные цепи ДНК синтезируются в обоих направлениях, начиная от праймеров (рис. 3, 3-й этап).

Для проведения синтеза ДНК в оптимальных для *Taq* ДНК-полимеразы условиях температуру смеси увеличивают до 72<sup>0</sup>С и проводят элонгацию вновь синтезирующейся ДНК в течение 0,5–2 мин, при этом время инкубации зависит от длины анализируемого фрагмента.

По окончании стадии синтеза ДНК заканчивается первый цикл ПЦР, после чего повторяют в таком же режиме второй, третий и последующие циклы (20–30-кратно) в автоматическом режиме (рис. 4).

Гибридной (рис. 4) будем называть молекулу ДНК, состоящую из одной цепи матричной ДНК и цепи вновь синтезированной ДНК, с одной стороны ограниченной праймером-затравкой. Вновь синтезированная ДНК – это ДНК, состоящая из одной цепи ДНК, ограниченной праймером-затравкой только с одной стороны. Длина таких молекул ДНК длиннее требуемого ПЦР-продукта. В ПЦР-продукте обе цепи ДНК ограничены праймерами-затравками с обеих сторон.

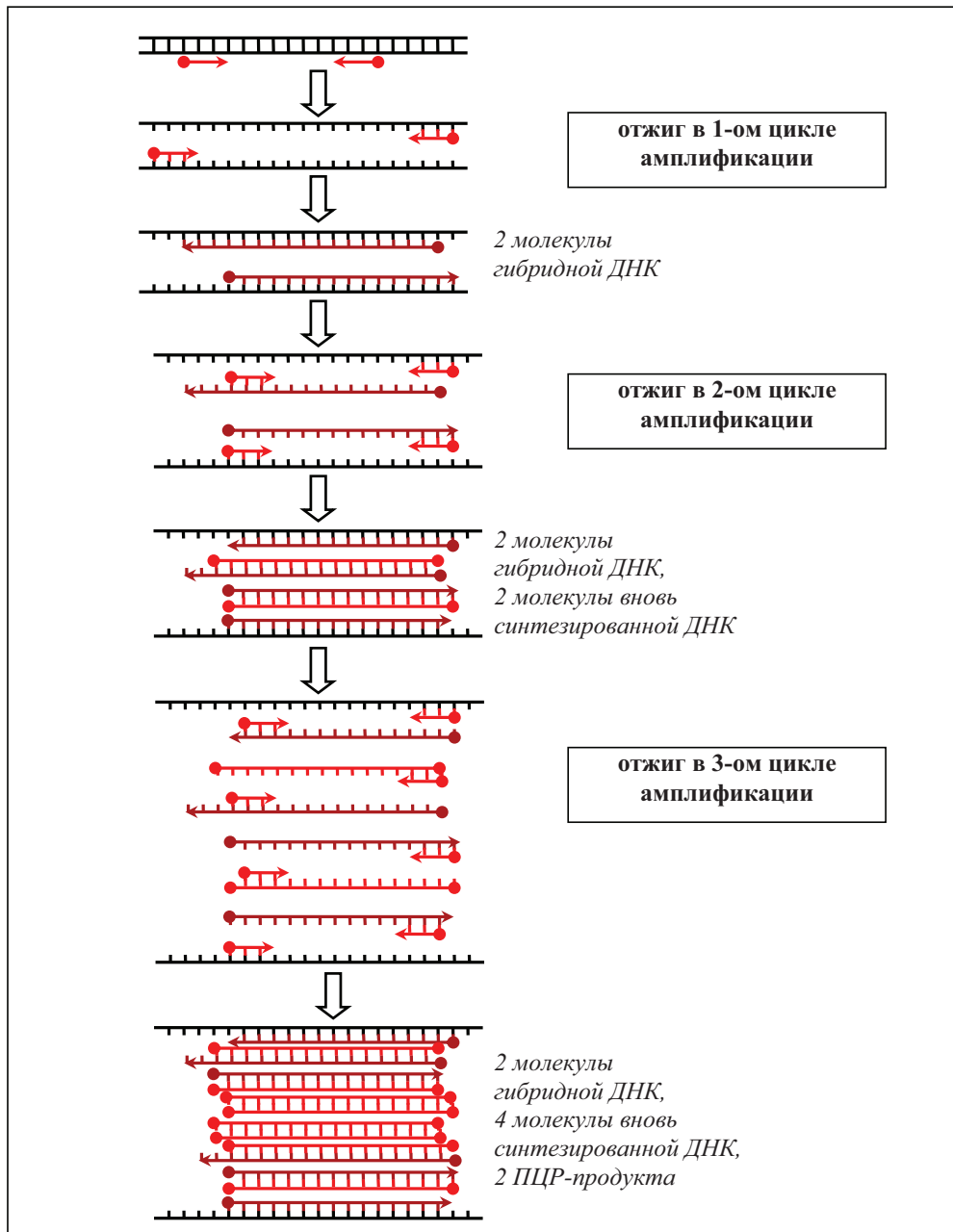


Рис. 4. Схема многократного умножения фрагмента ДНК в ходе ПЦР.

В результате процесса амплификации увеличение количество анализируемого фрагмента ДНК происходит по экспоненте по формуле  $2^n$ , где  $n$  – число прошедших циклов амплификации. При этом ПЦР-продукты - двунитевые фрагменты ДНК, равные по длине расстоянию между двумя праймерами, - появляются в реакционной смеси только после третьего цикла амплификации, однако, накапливаясь, именно они после 25-30 циклов амплификации будут составлять основное количество молекул в реакционной смеси.

Все стадии полимеразной цепной реакции: нагревание и охлаждение - проводятся в термостатируемом амплификаторе (термоциклере) с программируемым температурным режимом.

Возможность амплификации отдельных генов или фрагментов ДНК и получение их по завершении ПЦР в гомогенном виде и препаративном количестве делают ПЦР альтернативой молекулярному клонированию коротких фрагментов ДНК, полученных с помощью более сложных методических приемов, в которых используются рестриктазы, векторы и клетки-хозяина.

## ГЛАВА 3

### ТЕОРИЯ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНОВ

#### 3.1. Введение основных понятий

*Клонирование генов* – это процедура многократного копирования фрагментов ДНК в реципиентных клетках.

*Реципиентные клетки* - это клетки, выбранные для клонирования гена, они могут быть как про-, так и эукариотическими. Чаще всего для этой цели используют бактерии, поскольку их легко получать в большом количестве. В бактериях можно клонировать гены самых разных организмов: других бактерий, растений, животных. Если стоит задача клонирования гена из клеток млекопитающих, то для ее решения предпочтительнее использовать клетки эукариот (например, дрожжи, культивируемые клетки животных), из-за неспособности ДНК эукариотических генов, содержащей интроны, экспрессироваться в прокариотической клетке.

*Клон* – группа клеток, происходящих от одной предковой клетки.

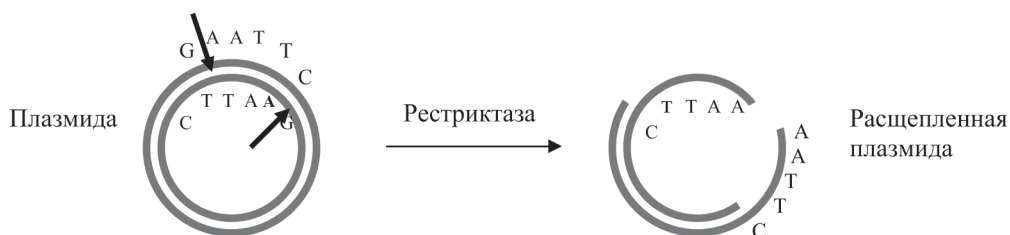
Как уже упоминалось выше, кроме ПЦР, существует более сложная технология, с помощью которой достигается клонирование генов - это технология с использованием рестриктаз, векторов и клеток-хозяев. В настоящее время используют две базовые схемы клонирования генов (Рис, Стернберг, 2002). Согласно первой схеме, геномную ДНК сначала расщепляют случайным образом с помощью рестрицирующих эндонуклеаз на небольшие фрагменты или амплифицируют на специфичных праймерах-затравках. Далее каждый фрагмент вводят с помощью вектора в реципиентную клетку, которая затем размножается, амплифицируя при этом ген или гены, содержащиеся в данном фрагменте. Согласно второй схеме, с информационной РНК, выделяемой из однотипных клеток организма, снимают копии комплементарной ДНК (кДНК), которые затем вводят в реципиентные клетки, в среднем по одному гену на одну клетку, и

амплифицируют тем же способом, что и в первом случае. В рамках практикума по молекулярной экологии микробных сообществ в качестве базовой мы использовали первую схему клонирования, адаптируя ее под стоящую задачу оценки бактериального разнообразия и последующего филогенетического анализа.

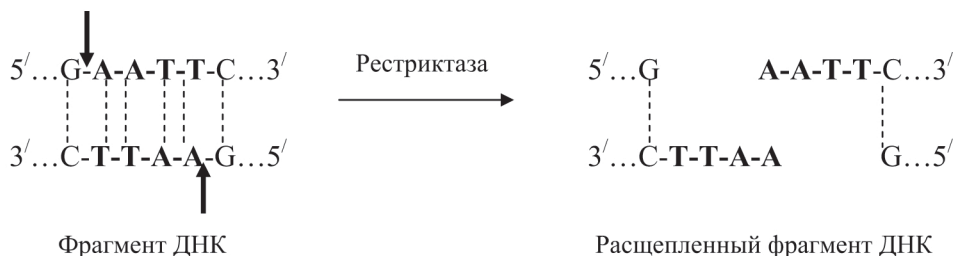
### 3.2. Клонирование генов в клетках *E.coli*

#### 3.2.1. Механизм клонирования гена.

Плазмиду расщепляют рестрикционной эндонуклеазой в специфическом участке (сайте рестрикции) в обеих цепях ДНК так, что на концах расщепленной плазмиды располагаются короткие неспаренные последовательности двух одноцепочечных 5'-выступающих концов ТТАА или двух одноцепочечных 5'-выступающих концов ААТТ:



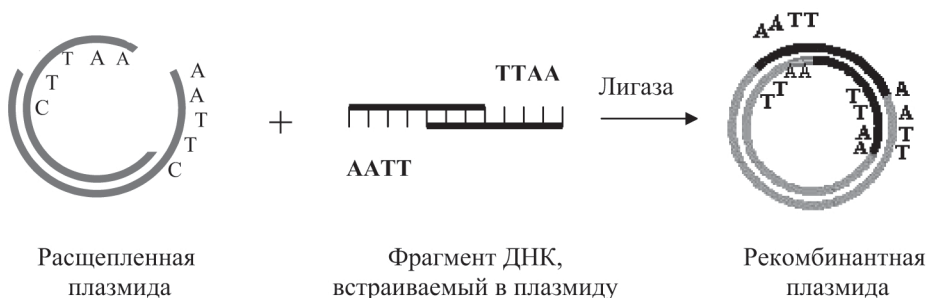
Ген (фрагмент ДНК), который встраивают в плазмиду, с помощью этой же рестриктазы вырезают так, что его концы являются комплементарными последовательностям ААТТ или ТТАА на концах плазмиды:



В практических занятиях по характеристике генетического разнообразия микроорганизмов в микробных сообществах в качестве встраиваемого ДНК-фрагмента мы использовали ПЦР-продукт – фрагмент гена 16S рРНК, полученный при амплификации тотальной ДНК, выделенной из микробного сообщества, с помощью универсальных бактериальных праймеров. На следующем этапе проводили лигирование этого продукта в плазмидный клонирующий вектор.

### 3.2.2. Лигирование ПЦР-продукта (гена, фрагмента ДНК) в плазмидный вектор.

**Лигирование** – это сшивание ДНК гена и плазмиды *in vitro* с помощью ДНК-лигазы. При этом образуется рекомбинантная плазмида:



Лигирование ПЦР-продуктов в плазмидные вектора основано на особых свойствах термофильных *Taq* ДНК-полимераз. Известно, что *Taq*-ДНК-полимеразы при выдержке в последнем цикле ПЦР на стадии элонгации больше 5 мин достраивают с высокой степенью вероятности дополнительную букву дА и, таким образом, образуются ПЦР-продукты с 3'-выступающими концами в одну букву А:





Наличие у линейризованных плазмидных векторов концов с одной буквой дТ оказывается достаточным для комплементарного узнавания А-концов ПЦР-продуктов и их сшивки ДНК-лигазой. Этот тип клонирования называется АТ-клонированием:



Для уменьшения количества ошибок при амплификации в последнее время широко используют ДНК-полимеразы с корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активностью. Такие ДНК-полимеразы дают ПЦР-продукты с тупыми концами. Поэтому в настоящее время есть серия плазмидных векторов, предназначенных для тупого лигирования.

После лигирования проводят трансформацию компетентных клеток *E. coli* гибридным плазмидным вектором.

### 3.2.3. Трансформация клеток *Escherichia coli*.

**Трансформация** – это искусственный процесс, в ходе которого плазмиды вводят в компетентные клетки бактерии.

**Компетентность клеток** – это способность клеток к захвату экзогенной ДНК.

*E. coli* не обладает физиологической компетентностью к поглощению экзогенных молекул ДНК. Поэтому для введения ДНК внутрь этой грамотрицательной бактерии надо создать условия, позволяющие преодолеть барьер клеточной стенки. Одним из первых таких методов стала система сферопластов *E. coli*, которые получают обработкой бактериальных клеток в

изотоническом растворе лизоцимом. Лизоцим, гидролизующий пептидогликан грамположительных клеток, в тех же условиях не гидролизует пептидогликаны грамотрицательных бактерий, поскольку не может проникнуть через внешнюю мембрану клетки. Липополисахаридный слой внешней мембраны грамотрицательных бактерий стабилизирован ионами двухвалентных металлов. Обработка комплексообразующим агентом ЭДТА позволяет частично денатурировать внешнюю мембрану, часть липополисахаридов при этом высвобождается, а пептидогликановый слой становится доступным для лизоцима, который расщепляет в нем гликозидную связь между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой. При этом полисахаридные цепи распадаются на дисахара. ДНК проникает в сферопласты в нативной двухцепочечной форме.

Более эффективным является метод трансформации  $\text{CaCl}_2$ -зависимых клеток. Суть метода заключается в обработке культуры *E.coli* раствором  $\text{CaCl}_2$  на холоде ( $0^\circ\text{C}$ ) с последующим тепловым шоком при  $37\text{--}42^\circ\text{C}$ . Механизм индукции компетентного состояния обусловлен ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , которые, предположительно, индуцируют фазовый переход липидов внешней мембраны, которая приобретает вместо обычной двухслойной необычную гексагональную конфигурацию. Этот переход происходит во время температурного шока и сопровождается поглощением плазмидной ДНК. Детали процесса неизвестны. Существует зависимость температуры фазового перехода от состава липидов внешней мембраны. Последующее охлаждение до  $0^\circ\text{C}$  также ведет к фазовому переходу липидов, и молекулы ДНК снова могут проникать в клетки. При этом продолжительность этого фазового перехода длиннее. Ряд данных указывает на то, что фазовые нарушения затрагивают только внешнюю мембрану клетки, а через плазматическую мембрану *E.coli* молекулы ДНК способны проникать без теплового шока и без бивалентных катионов, однако, в целом, детали проникновения ДНК в клетки *E.coli* при трансформации неизвестны.

В настоящее время разработан и широко применяется физический метод электропорации - введения экзогенных молекул ДНК в клетку. Суть его заключается в том, что кратковременное воздействие (обычно 5-20 мс) электрического поля высокой напряженности (1-15 кВ/см) на внешнюю мембрану приводит к образованию в ней пор. Время существования и размер таких пор достаточны, чтобы такие макромолекулы как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил.

### **3.3. Прямая селекция клонов, содержащих плазмиду со вставкой ПЦР-продукта**

После того, как рекомбинантные плазмиды вводят в клетки *E.coli*, последние размножаются, и каждая клетка с рекомбинантной плазмидой образует клон, все клетки которого также содержат гибридную плазмиду, а, следовательно, и встроенный в нее фрагмент чужеродной ДНК.

Основная задача после клонирования заключается в том, чтобы надежно дифференцировать клетки с плазмидным вектором без вставки и клетки с гибридными плазмидами. Поэтому вектор для клонирования подбирают таким образом, чтобы обеспечить наиболее эффективное выявление рекомбинантов путем скрининга колоний *E.coli*.

**Скрининг колоний** («просеивание») - поиск среди множества колоний клеток тех, которые имеют в своем составе векторы с встроенными генами.

Отбор клонов, полученных после АТ-лигирования, проводится методом «бело-голубого» скрининга (Sambrook et al., 1989).

#### 3.3.1. Бело-голубой скрининг клонов.

Этот тип скрининга основан на использовании в качестве генетического маркера гена β-галактозидазы. Разрыв кольцевой плазмиды в линейную форму для лигирования в данном случае происходит внутри гена β-галактозидазы. В случае, если плазида зашивается ДНК-лигазой сама на

себя, ген синтеза  $\beta$ -галактозидазы оказывается ненарушенным, и клетки продуцируют этот фермент. Если в среду для клеток в качестве селективного маркера добавить X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-галактопиранозид) - краситель, который разрушается  $\beta$ -галактозидазой с образованием окрашенного в синий цвет продукта, то колонии, содержащие ненарушенный ген, будут окрашены в синий цвет. Встройка экзогенного ПЦР-продукта происходит по сайту, локализованному внутри этого гена. Встроенный ПЦР-продукт нарушает рамку считывания гена, фермент не синтезируется, X-gal в среде не разрушается и продукт синего цвета не образуется. Следовательно, колонии, содержащие плазмиду со вставкой, остаются неокрашенными.

Клетки без плазмиды не вырастают, потому что плазмидный вектор имеет еще один генетический маркер – ген устойчивости к ампициллину, и выращивание клеток на среде с ампициллином дает прямую положительную селекцию колоний, несущих плазмиду. Таким образом, отбирают все неокрашенные колонии, подразумевая, что они несут плазмиду со вставкой.

### 3.3.2. Метод инактивации летального гена эндонуклеазы рестрикции.

Коммерческий набор GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas) для тупоконечного лигирования – это система положительной селекции высоко эффективного клонирования ПЦР-продуктов, полученных с помощью *Pfu*, *Taq* или любой другой термостабильной ДНК-полимеразы. В набор входит высококопийный вектор для положительной селекции pJET/blunt. Этот вектор содержит ген эндонуклеазы рестрикции, который летален для всех штаммов *E.coli*, обычно используемых для клонирования. Лигирование фрагмента ДНК в клонируемое положение разрывает этот летальный ген. Таким образом, размножаться способны только клетки, содержащие рекомбинантные плазмиды. В этом случае все выросшие колонии несут плазмиду со вставкой.

## **II. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭКОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ**

### **ГЛАВА 4 МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИЗУЧЕНИИ СОСТАВА МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ**

Микроорганизмы играют важную роль в водных экосистемах. Обладая большой скоростью размножения и создавая значительную биомассу, они участвуют в процессах самоочищения водоемов, минерализуя органические вещества и, тем самым, обогащая воду биогенными элементами. Изучение таксономического разнообразия бактерий и особенностей их распространения в зависимости от экологических условий является фундаментальным направлением в водной микробиологии. Однако, долгое время эти исследования ограничивались методологическим подходом, требующим выделения чистой культуры и использования субъективных критериев для классификации. При этом описывали морфологические, культуральные, физиолого-биохимические и серологические признаки, по которым устанавливали принадлежность бактерий к тому или иному виду. Однако, сравнительно недавно было показано, что из природных образцов культивируется не более 10-15% от общей численности бактерий (Amann et al., 1995). Несомненно, что существенная часть микробного сообщества при использовании такого подхода остается не изученной. Развитие методов молекулярной биологии дает новые инструменты и новые перспективы для исследований. За последние 20 лет появились новые направления исследований не только отдельных бактериальных штаммов, но и микробного сообщества в целом (Blackstone et al., 2003; Ellis et al., 2003).

Молекулярная идентификация микроорганизмов привела к возникновению новой дисциплины – филогенетической таксономии микроорганизмов. В настоящее время создан большой банк данных

последовательностей рибосомальных генов, сравнительный анализ которых лежит в основе современной филогенетической классификации микроорганизмов (<http://srs.ebi.ac.uk>). Этот банк данных включает в себя нуклеотидные последовательности не только культивируемых штаммов, но и последовательности, полученные молекулярными методами из различных микробных сообществ. Рибосомальные гены имеют ряд преимуществ перед другими геномными последовательностями в плане их использования для изучения биоразнообразия. Эти гены имеются во всех организмах, они содержат как консервативные, так и переменные районы. Высококонсервативные последовательности используют в качестве мишеней при оценке общей численности (Schloss et al., 2005), а переменные служат сайтами узнавания для зондов, специфичных к конкретным группам или родам при видовой идентификации микроорганизмов (Thoerner et al., 2003). Таким образом, 16S рДНК стала удобным инструментом для видовой диагностики, а расхождения нуклеотидных последовательностей среди индивидуальных генов определяют очертания естественной классификации бактерий. Построение филогенетических древ позволяет выявлять близкие и отдаленные группы микроорганизмов, составляющих микробные сообщества, восстанавливать возможные филогенетические связи между этими группами и, таким образом, делать заключение об их родстве, вносить изменения в существующую классификацию микроорганизмов и проводить ее реконструкцию (Romanuk et al., 1987; Anzai et al., 2000). Кроме того, в настоящее время проводится поиск наиболее достоверных маркерных белков – кодирующих генов для построения эволюционных взаимоотношений разных групп микроорганизмов (Henz et al., 2004). Широкое развитие получил метод гибридизации *in situ*, позволяющий выявлять отдельные бактериальные клетки непосредственно в образцах и, таким образом, изучать состав микробного сообщества без культивирования (DeLong et al., 1989; Amann et al., 1995). Этот метод используется как в экологической

микробиологии для анализа состава природных микробных сообществ (Gloeckner et al., 1999), так и в технической микробиологии для быстрой детекции патогенных и условно патогенных микроорганизмов (Fang et al., 2003).

Первые попытки охарактеризовать микробное сообщество в природных образцах по рибосомальным генам были предприняты около 20 лет назад. В 1985 году была показана возможность использования рибосомальных генов как для изучения идентификации отдельных микроорганизмов (Lane et al., 1985), так и для изучения микробного сообщества в целом в природных образцах без культивирования (Stahl et al., 1985). Эти исследования были сделаны на основании анализа 5S рибосомальной ДНК. В первой серии экспериментов были определены нуклеотидные последовательности 12 штаммов рода *Thiobacillus* (Lane et al., 1985). Сравнение их между собой и с имеющимися на тот момент последовательностями в банке данных показало, что филогенетический кластер, включающий последовательности тиобацилл, группируется вместе с «пурпурными фотосинтезирующими микроорганизмами» и может быть эволюционно привязан к этой группе. Этой же группой авторов было охарактеризовано природное сообщество микроорганизмов в термальных источниках Национального Парка Йеллоустоун, температура воды в которых около 90°C (Stahl et al., 1985). Авторами было показано, что микробное сообщество представлено микроорганизмами, которые образовали три основных кластера на филогенетическом древе. Доминирующими были определены серные бактерии, кластеризующиеся с представителями архебактерий. Эубактериальные последовательности образовали два кластера, отдаленно связанных с родом *Thermus*. Это были, действительно, пионерские исследования, которые носили прогрессивный характер, и в результате которых был предложен принципиально новый подход для изучения экологии микроорганизмов - филогенетический анализ. Однако,

информативное содержание 120-нуклеотидного фрагмента гена 5S рРНК оказалось недостаточным для корректного построения филогенетических древ и анализа большого разнообразия микроорганизмов. Поэтому вскоре в качестве объекта для следующих работ был выбран более протяженный ген 16S рРНК. Этот ген содержит около 1500 пар нуклеотидов; он оказался настолько удобным для молекулярно-биологических исследований, что в настоящее время банк данных этих последовательностей растет и на декабрь 2002 года он составил более 166 тыс. последовательностей (<http://srs.ebi.ac.uk>).

С самого начала применения молекулярно-биологического подхода в микробиологических исследованиях сформировались два направления сравнительного анализа рибосомальных генов. С одной стороны, проводилась ревизия бактериальных родов и устанавливались вероятные эволюционные связи (Olsen et al., 1985; Giovannoni et al., 1988a; Turner et al., 1989; Romanuk et al., 1987; Anzai et al., 2000), а с другой стороны, были предложены новые методы анализа природных бактериальных популяций (DeLong et al., 1989; Ward et al., 1990; Giovannoni et al., 1990; Amann et al., 1995).

Одним из самых крупных достижений следует отметить выделение на высшем таксономическом уровне в живом мире трех групп организмов: эукариот, прокариот и архебактерий (Woese, Fox, 1977). Эти исследования были проведены на основании сравнения олигонуклеотидных карт, полученных в результате анализа продуктов гидролиза РНК ферментами РНКазами (Woese, Fox, 1977), и анализа частичных последовательностей рибосомальных генов, имеющихся к тому времени в банке данных. Были исследованы филогенетические отношения 450 различных организмов, включая эукариоты и прокариоты. В результате было показано, что одну группу образовали все эукариоты: высшие растения, животные, дрожжи и др. Вторую группу составило подавляющее большинство видов бактерий и



цианобактерии. Они получили название истинных бактерий или эубактерий. В эту группу также вошли митохондрии и хлоропласты эукариотических клеток. И отдельную, третью группу составили бактерии, обитающие в экстремальных условиях: метанобразующие анаэробные бактерии, экстремальные термофилы. Эта группа организмов получила название архебактерий.

Одни из первых молекулярно–микробиологических, филогенетических исследований были проведены на термоацидофильной архебактерии *Sulfolobus solfataricus*, нуклеотидную последовательность 16S рДНК которой использовали для выяснения эволюционных взаимосвязей с последовательностями галофильных и метанобразующих архебактерий, эукариот и эубактерий (Mankin et al., 1985; Olsen et al., 1985). Авторами было показано, что нуклеотидная последовательность этой бактерии группируется с последовательностями других архебактерий. Таким образом, на конкретном примере была продемонстрирована возможность использования молекулярного подхода для филогенетической идентификации микроорганизмов. Следующим революционным событием можно считать установление эволюционных связей цианобактерий и хлоропластов зеленых водорослей (Giovannoni et al., 1988a; Turner et al., 1989). В серии работ были представлены филогенетические деревья, указывающие, что различные виды цианобактерий разошлись в эволюционно короткий промежуток времени. Глубина ветвления исследуемых цианобактерий была в основном меньше, чем та, которая отделяла их от основных эубактериальных таксонов.

Перспективы филогенетического анализа также включают в себя возможность проведения ревизии не только отдельных родов, но и крупных бактериальных групп. Попытки проанализировать корректность выделения некоторых бактериальных родов и принадлежность родов к известным семействам были предприняты практически сразу же, как только был накоплен достаточный фактический материал в виде нуклеотидных

последовательностей гена 16S рРНК культивируемых штаммов. А в настоящее время трудно назвать бактериальную группу, для которой не проводилось бы подобной ревизии. Одной из первых работ этого направления можно по праву считать филогенетический анализ рода *Campylobacter* (Romanuik et al., 1987). Авторами были определены последовательности рибосомальной ДНК типовых штаммов этого рода и проведен их филогенетический анализ. Было показано, что представители этого рода формируют неописанную ранее, самостоятельную филогенетическую ветвь, которую можно охарактеризовать как одну из эубактериальных групп на основании раннего ветвления, которое наблюдается и для всех остальных основных групп эубактерий. Вид *Campylobacter pylori*, являющийся спиралевидной бактерией, вызывающей желудочные заболевания человека, на филогенетическом древе оказался достаточно удален от других представителей рода *Campylobacter*, что позволило выделить его из этого рода.

Другой крупный пример реформирования родов – это предложенная в 2000 году, по сути своей, революционная перестройка рода *Pseudomonas* (Anzai et al., 2000). Фенотипическое определение, которое является достаточно субъективным, позволило роду *Pseudomonas* стать «свалкой» для не до конца охарактеризованных грамотрицательных аэробных палочек, имеющих полярные жгутики. В настоящее время в этот род включено огромное количество видов. Нуклеотидные последовательности 128 достоверных и недостоверных представителей рода *Pseudomonas* были проанализированы авторами работы. Эти последовательности сравнивали с последовательностями представителей других филогенетических подгрупп протеобактерий. Семь кластеров было выделено для рода *Pseudomonas*, причем, наличие и положение этих кластеров хорошо согласуется с исследованиями РНК-ДНК-гибридизации, проведенными ранее (Palleroni, 1984). Результаты показали, что 57 видов, включая штамм *Pseudomonas*

*aeruginosa*, достоверно можно отнести к этому роду. Остальные виды авторы не относят к этому роду, ввиду их филогенетической позиции. Они оказались отнесенными в кластеры, которые расположились во всех четырех подгруппах протеобактерий (альфа, бета, гамма и гамма-бета). Род *Pseudomonas* по филогенетической классификации относится к гамма-подгруппе протеобактерий.

В настоящее время другой группой авторов проводится ревизия семейства Vibrionaceae (Kita-Tsukamoto et al., 1993; Thompson et al., 2003). Сейчас это одно из самых изученных семейств, основные представители которого выделены из водных и почвенных экосистем. Только в последнее время было охарактеризовано 15 новых видов и описан новый род *Enterovibrio* (Thompson et al., 2002). На основе анализа фенотипических и генотипических характеристик известных штаммов авторами предложено выделение трех новых семейств из семейства Vibrionaceae, а именно - Enterovibrionaceae, Photobacteriaceae, Salinivibrionaceae (Kita-Tsukamoto et al., 1993; Huang et al., 2000; Thompson et al., 2002).

Кроме того, молекулярно-биологический подход нашел широкое применение при исследовании природных микробных сообществ, так как позволяет выявить более широкое разнообразие бактерий, включая и некультивируемые пока виды. На рис.5 представлена схема проведения молекулярно-биологических экспериментов.

Процедура анализа природной микробной популяции включает пять ключевых стадий: выделение суммарной бактериальной ДНК, амплификацию, клонирование, секвенирование и сравнительный анализ. В настоящее время практически все стадии этого подхода хорошо отработаны и стали рутинными методами исследований.

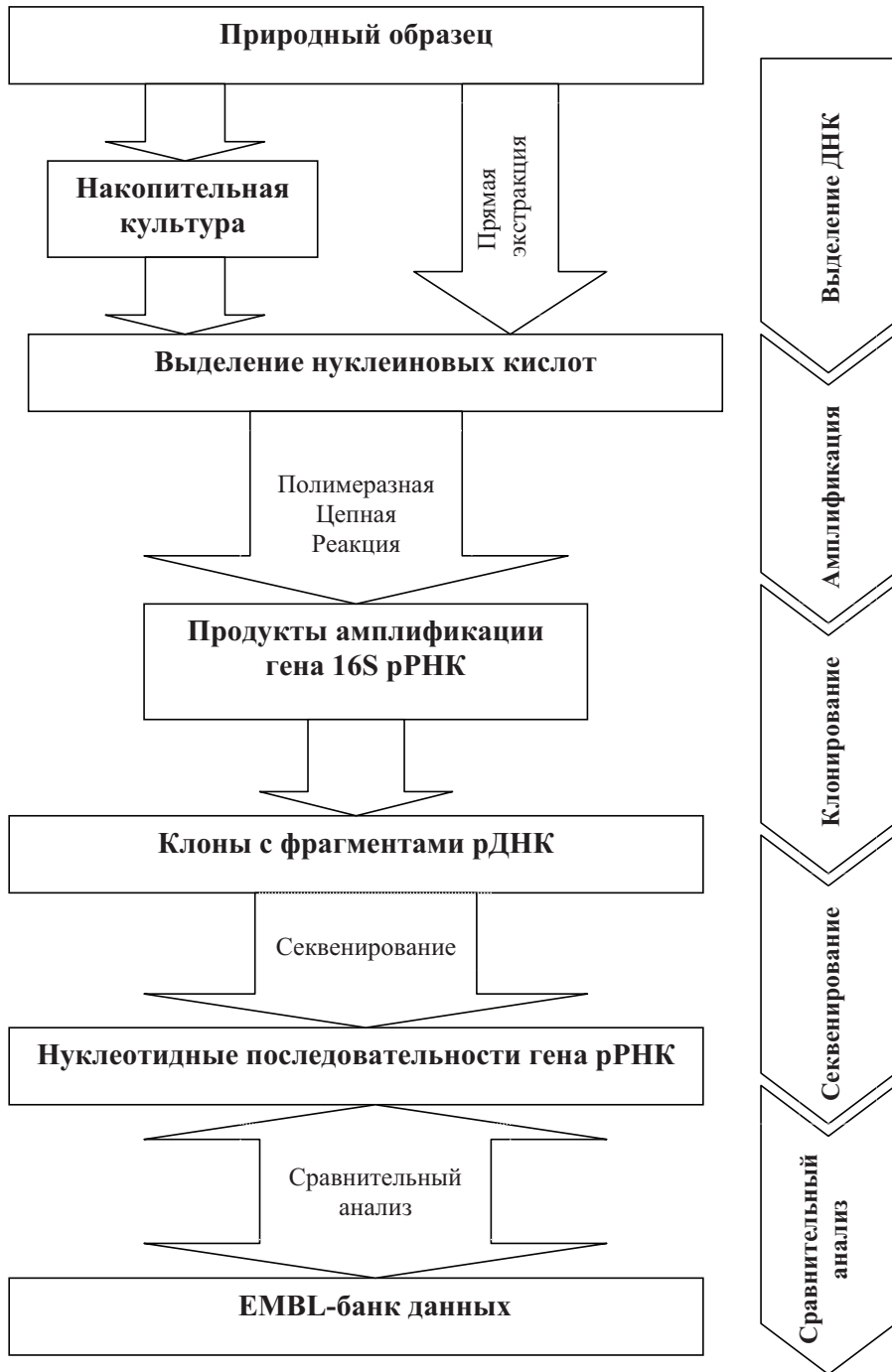


Рис.5. Схема проведения молекулярно-биологических исследований природных образцов (по Amann et al., 1995).

Однако, следует отметить, что такие стадии как выделение ДНК и амплификацию можно считать ключевыми и именно от их успешного выполнения полностью зависит результат анализа. На этих стадиях следует не только учитывать особенности состава определенных бактериальных сообществ, но и необходимо предупредить возможное бактериальное загрязнение. Этим проблемам была посвящена серия публикаций, в которых подробно описывались требования к проведению этих работ.

Кроме того, оказалось, что режим полимеразной цепной реакции (ПЦР) и подбор праймеров также могут существенным образом влиять на конечный результат исследований (von Wintzingerode et al., 1997; Chandler et al., 1997). Оказалось, что при амплификации длинных фрагментов при режиме, обеспечивающем максимальное представительство бактерий, кроме истинных представителей, получается большое количество (иногда до 30%) химерных молекул (Wang, Wang, 1996). Эти последовательности образуются в результате неспецифической регибридизации не полностью удлиненных на предыдущем цикле амплификации цепей ДНК с «неродной» ДНК. Разные участки в таких молекулах принадлежат разным микроорганизмам. Несомненно, что они получают при амплификации с имеющихся в составе популяции рибосомальных фрагментов, однако, при филогенетическом анализе и построении древ подобные последовательности использовать нельзя. Вскоре был предложен достоверный способ выявления таких нуклеотидных последовательностей. И если после открытия полимеразной цепной реакции через два года появились первые исследования по молекулярному анализу некультивируемых природных микробных сообществ, то на выработку оптимальных условий, уточнение ошибок, возникающих при использовании амплификации суммарной ДНК, и предложение методов устранения этих ошибок, ушли следующие 15 лет.

Результаты молекулярно-биологического анализа некультивируемых микроорганизмов, выделенных непосредственно из природных сообществ,

превзошли все возможные ожидания. Было выявлено большое количество нуклеотидных последовательностей, которые имели низкий процент гомологии с последовательностями культивируемых штаммов (Ward et al., 1990; Bruce, 1993; Wise et al., 1997; Garcia-Martinez et al., 1999; Gray, Head, 2001). Было показано, что такие новые, ранее некультивируемые группы бактерий характерны для самых разнообразных природных экосистем, как морских, так и пресноводных или почвенных (Ward et al., 1990; Kuske et al., 1997; Borneman, Triplett, 1997). Причем, последовательности некультивируемых микроорганизмов, выделенных, например, из пресных озер, на филогенетическом древе кластеризуются вместе с последовательностями, полученными аналогичными методами из других пресноводных и, иногда, почвенных экосистем (Wise et al., 1997). Кроме того, было показано, что такие кластеры некультивируемых бактерий выявляются в различных бактериальных группах (Bahr et al., 1996; Gloeckner et al., 2000). Это позволило говорить о том, что это реально существующие группы, выделение которых возможно через накопительную культуру. Именно так и были выделены представители двух редких групп *Nitrospira* и *Holophaga*, которые представляют отдельные филогенетические группы, ввиду их обособленного положения на филогенетическом древе (Ehrich et al., 1995; Ludwig et al., 1997). Обе группы представлены в банке данных преимущественно последовательностями некультивируемых видов. Однако, проведены успешные попытки получения накопительной культуры бактерий рода *Holophaga* (Ludwig et al., 1997).

Таким образом, к началу 90-х годов уже появился достаточно большой банк данных рибосомальных последовательностей как культивируемых, так и некультивируемых микроорганизмов, что позволило развить такое направление исследований, как выявление отдельных бактериальных клеток, непосредственно в природном образце без культивирования, с помощью специфических олигонуклеотидных зондов. Зонды - это короткие

одноцепочечные нуклеотидные фрагменты, имеющие гомологию либо с высококонсервативными, либо с переменными последовательностями рибосомальных генов, несущие флуоресцентную или нефлуоресцентную метку и позволяющие селективно выявлять наличие ДНК определенного состава. Отдельная клетка *E.coli* содержит от  $10^4$  до  $10^5$  рибосом (Amann et al., 1990a) и, таким образом, столько же копий рибосомальных ДНК. Следовательно, рДНК является естественной амплифицированной мишенью для гибридизационных зондов. В 1988 году было впервые показано, что благодаря наличию большого количества копий, индивидуальные клетки могут быть идентифицированы однократно меченым радиоактивным зондом (Giovannoni et al., 1988b). Позднее флуоресцентно-меченые зонды были использованы для прямой идентификации отдельных клеток. Термин «филогенетический штамм» был выбран для описания единой характеристики этих зондов (DeLong et al., 1989; Amann et al., 1990b). Хотя флуоресцентные антитела также применялись для идентификации отдельных клеток в природных образцах, их специфичность, в основном, ограничена уровнем вида и подвида (Macario et al., 1989; Ward et al., 1990). Кроме того, использование флуоресцентных антител для детекции микроорганизмов *in situ* требует предварительного выделения организма – мишени. В противоположность этому, потенциальная специфичность меченых зондов, гомологичных рибосомальной РНК, распространяется на весь филогенетический спектр. Более того, зонды, рассчитанные по имеющимся в банке данных последовательностям гена 16S рРНК, могут быть разработаны на те группы микроорганизмов, которые не существуют в чистых культурах и еще не выделены в лабораторных условиях (Olsen et al., 1986).

На рис.6 изображена схема этого подхода.

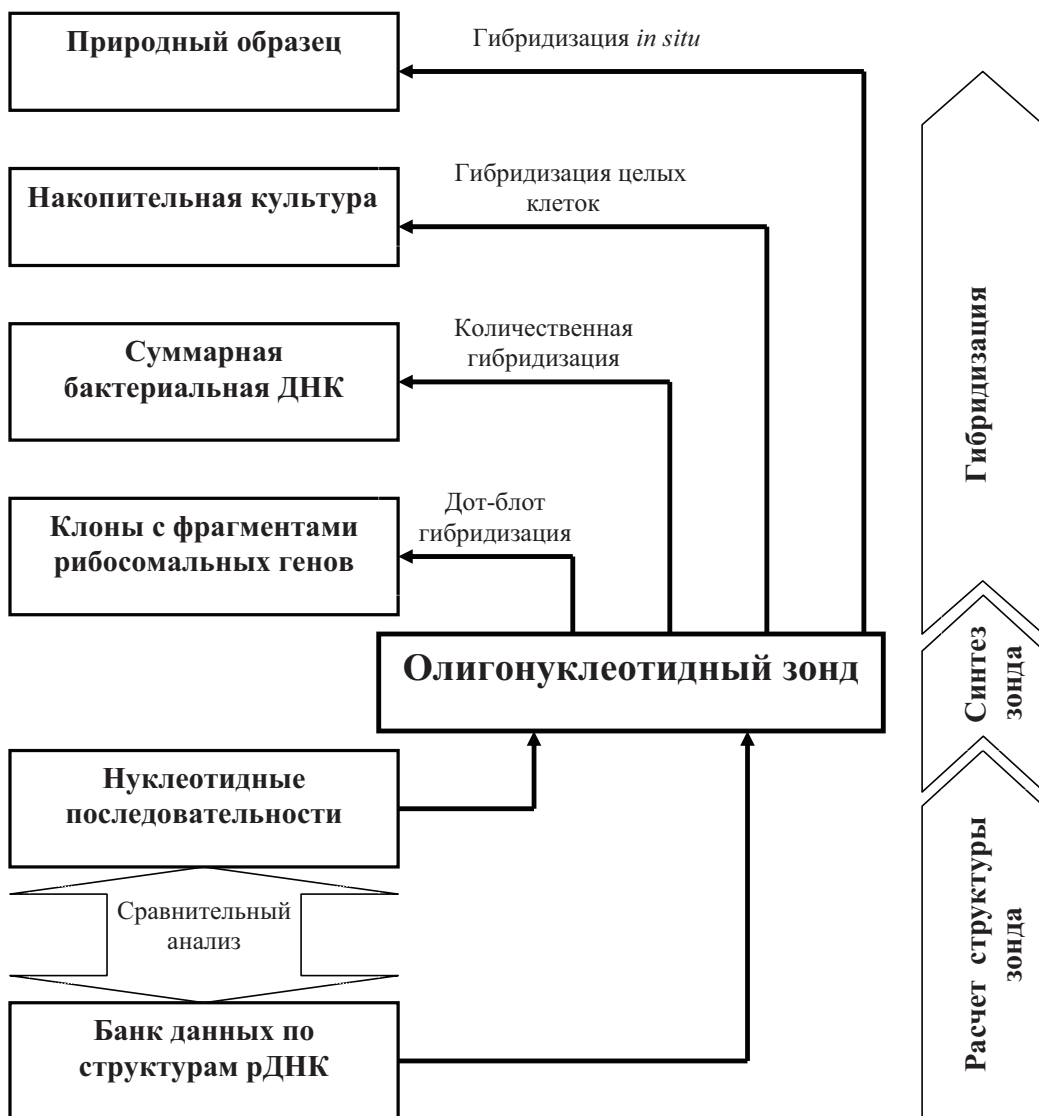


Рис.6. Схема, демонстрирующая различные возможности использования олигонуклеотидных зондов для характеристики природных образцов (по Amann et al., 1995).



Первоначально при создании зондов, комплементарных консервативным участкам гена 16S рРНК, был предложен набор зондов на крупные таксоны, такие как археобактерии и эубактерии, и филогенетические группы протеобактерий, включая подгруппы альфа, бета и гамма, актинобактерии, планктомицеты, цитофаги и флавобактерии (Giovannoni et al., 1988*b*; DeLong et al., 1989; Amann et al., 1995). При использовании в качестве мишеней высоко варьируемых последовательностей, конструируются видоспецифичные зонды, позволяющие выявить отдельные бактериальные виды.

Кроме того, универсальные зонды могут быть использованы для измерения суммарного количества рДНК в образце и для оценки различий в содержании клеточных рДНК (Stahl et al., 1988; Amann et al., 1990*b*). Описанный подход применяется также в медицинской и пищевой микробиологии. В настоящее время предложено быстрое и качественное тестирование молочных и кисломолочных продуктов, питьевой воды на наличие патогенных микроорганизмов (Blackstone et al., 2003; Thoerner et al., 2003). Как одно из практических применений, использование наборов из групп- и видо- специфичных зондов стало использование этого подхода для анализа природных и антропогенно-загрязненных экосистем (Snaidr et al., 1997; Pernthaler et al., 1998; Gloeckner et al., 1999). Впервые метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с групп-специфичными зондами был предложен именно для описания состава природных экосистем. Однако, вскоре было отмечено, что для большинства природных сообществ суммарный процент бактериальных групп, детектируемых зондами на известные высококонсервативные районы, оказывается существенно меньше, чем общая численность бактерий, определяемая по окрашиванию ДАФИ. Причины этого явления пытались объяснить вероятной детекцией ДАФИ вирусных частиц, присутствующих, зачастую, в природных образцах. Однако, наиболее вероятным объяснением может быть большое

разнообразие таких бактериальных групп, которые в настоящее время не культивируются на известных селективных средах, а определяются только при секвенировании суммарной ДНК, выделенной из природных образцов (Gloeckner et al., 1996). Исследователями на протяжении последних лет была показана возможность использования этого подхода для анализа состава самых разнообразных микробных сообществ: природных водных и почвенных популяций, созданных искусственно в пищевой промышленности или промышленных ферментных культиваторах, либо для анализа промышленных сточных вод, быстро и без культивирования. Одновременное использование нескольких зондов, меченных разными флуоресцентными красителями, позволяет определять разные типы клеток в одном и том же поле зрения. Кроме того, количественная микрофлуоретрия показала, что количество рДНК-специфичного зонда, которое связывается с клеткой *E.coli* варьирует от концентрации рибосом, а, следовательно, может характеризовать стадию и скорость роста клеток (DeLong et al., 1989).

Одно из новых направлений в молекулярной микробиологии - клонирование крупных фрагментов бактериальных геномов и анализ не только генетического, но и функционального разнообразия некультивируемых микроорганизмов (Rondon et al., 2000). Для разработки методов изучения не только полного разнообразия микробных популяций, но активности и функционирования, был использован бактериальный искусственный хромосомный (ВАС) вектор. Из почвенных образцов были получены две метагеномные библиотеки, которые содержали ДНК более  $1 \times 10^6$  п.н. Филогенетический анализ последовательностей гена 16S рРНК, восстановленных для одной из библиотек, показал, что она содержит ДНК большого разнообразия бактериальных групп, включая последовательности таких различных таксонов, как грамположительные бактерии с низким и высоким содержанием ГЦ-пар в ДНК, ацидобактерии, цитофаги и протеобактерии. Первоначальный скрининг библиотек в *E.coli*, выявил

несколько клонов, которые экспрессируют гетерологичные гены со вставок. Таким образом, было показано, что ВАС-вектор может быть использован для экспрессии и анализа ДНК из природных образцов. Фенотипы, экспрессированные с этих клонов, проявили антибактериальную, липазную, амилазную, нуклеазную и хемолитическую активности (Rondon et al., 2000; Courtois et al., 2003). Метагеномные библиотеки - мощное орудие в исследовании микроорганизмов, дающие информацию не только о генетическом разнообразии микроорганизмов. Конструирование подобных библиотек может быть новым подходом для изучения генома, который позволит связать филогенетическую и функциональную информацию о микробных популяциях, в которых доминируют микроорганизмы, трудно поддающиеся культивированию.

### III. МЕТОДИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

#### ОБЩАЯ СХЕМА ОСНОВНЫХ ЭТАПОВ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ ПО ИЗУЧЕНИЮ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ

Общая схема практических мероприятий по исследованию генетического разнообразия микробных сообществ представлена на рис.7:

1) на первом этапе проводят отбор проб, содержащих бактериальный материал (вода, перифитон, донные осадки и др.), из которых выделяют тотальную геномную ДНК (рис.7, стадия 1);

2) фланкируя фрагмент гена 16S рРНК консервативными бактериальными праймерами, проводят его амплификацию; полученный ПЦР-продукт содержит фрагменты этого гена из тотальной геномной ДНК всех микроорганизмов изучаемого микробного сообщества (рис.7, стадия 2);

3) полученные ПЦР-продукты разделяют далее путем лигирования в плазмидный вектор и последующей трансформации в клетки *E.coli* (рис.7, стадии 3 и 4);

4) получают отдельные клоны клеток *E.coli* с рекомбинантными плазидами и проводят скрининг колоний (рис.7, стадия 5);

5) из отдельных клонов клеток выделяют ПЦР-продукты, расшифровывают их нуклеотидные последовательности и далее проводят сравнительный и филогенетический анализ фрагментов гена 16S рРНК из микроорганизмов сообщества (рис.7, стадии 6, 7, 8).

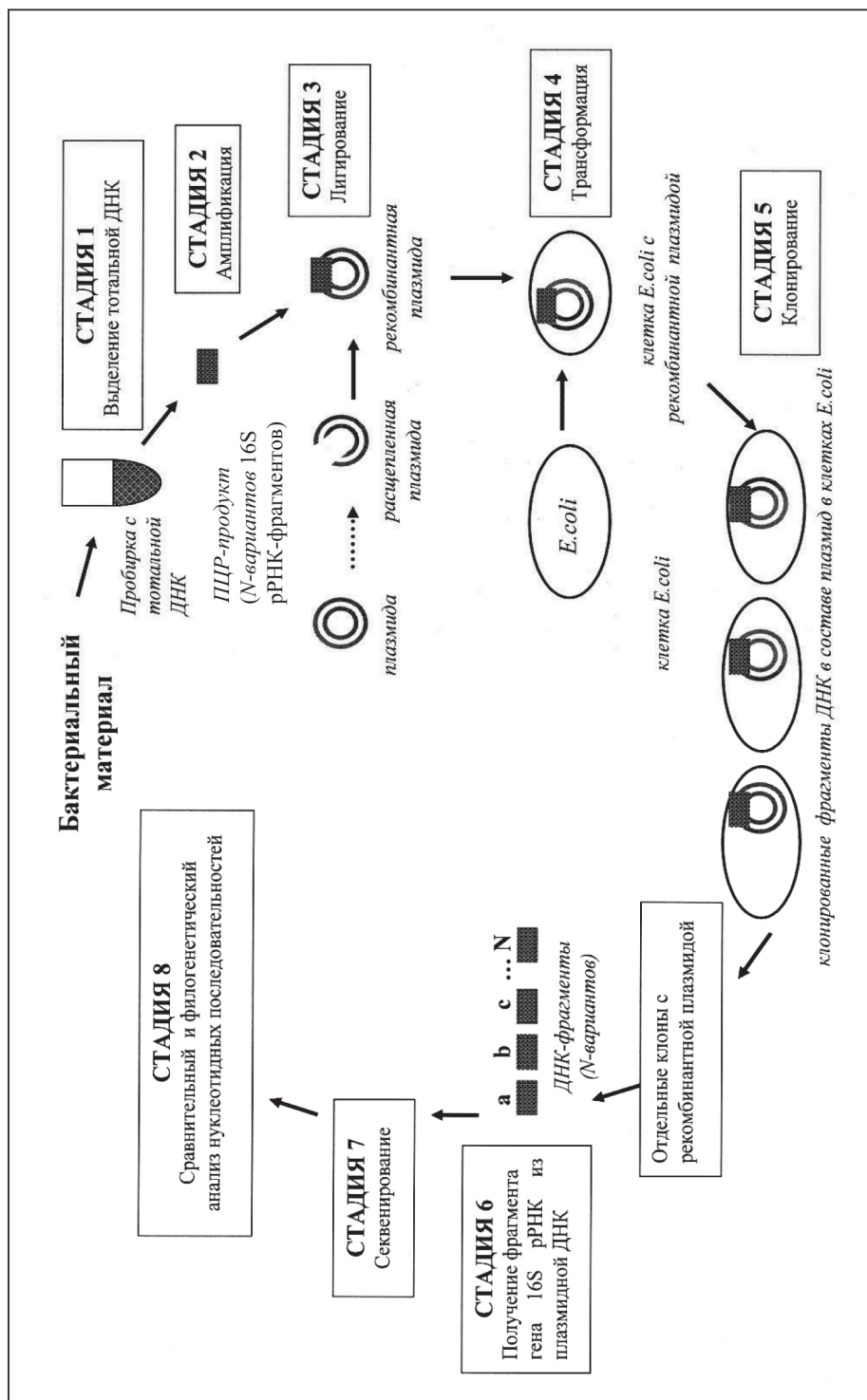


Рис. 7. Схема этапов практической работы по изучению генетического разнообразия микроорганизмов из микробных сообществ.

## ГЛАВА 5

### ТРЕБОВАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ПРОБООТБОРА И ФИКСАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

Все требования при отборе образцов бактериального материала сводятся к тому, чтобы не внести загрязнение бактериями, обитающими в окружающей среде, и не допустить размножения микроорганизмов в пробе. Поэтому основным и самым главным требованием при проведении отбора проб для молекулярно-генетического анализа является немедленная обработка или фиксация бактериального материала. Пробы воды должны быть профильтрованы через бактериальные фильтры, диаметр пор которых 0,45 или 0,22 мкм. Для фильтрации воды удобнее всего использовать фильтры Sterivex™-GV с диаметром пор 0,22 мкм компании Millipore (номер по каталогу SVGV01015) (рис.8, А). Это стерильный нитроцеллюлозный фильтр, упакованный в пластмассовый пенал. Пробы можно фильтровать с помощью перистальтического или вакуумного насоса под давлением не выше 0,5 атм. Кроме того, можно использовать пластмассовые, стеклянные или металлические фильтровальные установки (рис.8, Б, В).

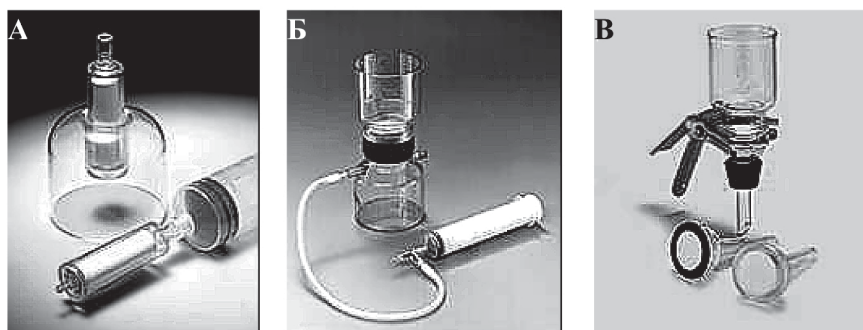


Рис. 8. Фильтрация бактериального материала с помощью: кассетных фильтров Sterivex (А), пластмассовой (Б) и стеклянной (В) установок.

Если после фильтрации предполагается смывать бактериальный материал, тогда необходимо использовать поликарбонатные фильтры, имеющие ровную поверхность фильтра (рис. 9, А). Нитроцеллюлозные фильтры состоят из волокон целлюлозы (рис. 9, Б). Фильтрование необходимо проводить до тех пор, пока фильтр полностью не забьется бактериальным материалом, учитывая при этом объем профильтрованной воды. Фильтр в стерильных условиях разрезают на сегменты. Если есть возможность немедленной обработки фильтра и выделения ДНК, его помещают в пробирки Эппендорф (объем пробирки 1,5 мл), заливают трис-солевым буфером, тщательно растирают гомогенизатором и далее проводят процедуру выделения ДНК. Если такой возможности нет, фильтр в трис-солевом буфере можно заморозить и хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ , либо зафиксировать этанолом (конечная концентрация этанола 70–80%). Пробы почвы или осадков сразу после пробоотбора замораживают в жидком азоте и хранят при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Безводные пробы бактериальных матов и любой материал, содержащий ассоциированные микроорганизмы, должен быть немедленно фиксирован 70%-ным этанолом, либо обработан лизирующими буферами. Хранить такие пробы можно при  $4^{\circ}\text{C}$ .

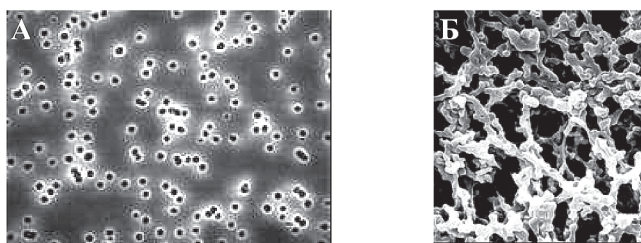
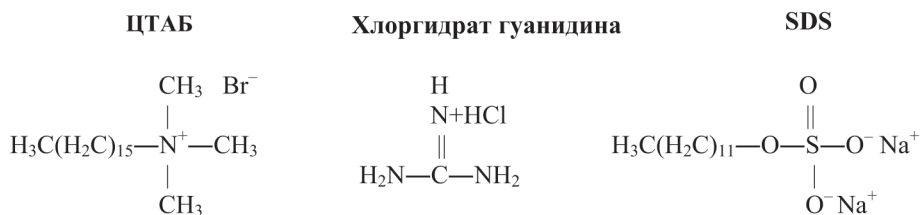


Рис. 9. Тонкая структура поликарбонатного (А) и нитроцеллюлозного (Б) фильтра под сканирующим электронным микроскопом.

## ГЛАВА 6

### ВЫДЕЛЕНИЕ СУММАРНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК

Процедура выделения нуклеиновых кислот включает три основные стадии: 1 - лизис клеточных стенок, 2 - денатурацию и удаление макромолекул клетки (белков, полисахаридов, липидов), 3 - осаждение нуклеиновых кислот. Лизис клеточных стенок проводят химическим (детергентами), ферментативным (ферментами) или механическим способом. В качестве детергентов используют хлоргидрат гуанидина, ЦТАБ в растворе высокой ионной силы и додецилсульфат натрия (SDS), а также щелочи:



Основным ферментом, используемым для разрушения бактериальных клеточных стенок, является лизоцим; дополнительную обработку проводят протеиназой К. Иногда перед проведением ферментативного или химического лизиса клетки разрушают механически, тщательно растирая материал пестиком в фарфоровой ступке, либо воздействуют на них ультразвуком, либо гомогенизируют пробу в гомогенизаторе (рис. 10).

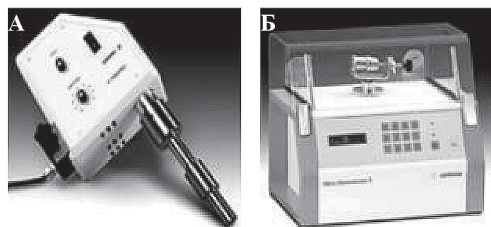


Рис.10. Типы гомогенизаторов: ультразвуковой гомогенизатор LABSONIC (А), Mikro-Dismembrator U – шаровая мельница (Б).



Многочисленные исследования природных микробных сообществ показали, что разнообразие генотипов, получаемых в результате молекулярно-генетических исследований, зависит от используемых методов выделения ДНК, в частности, от способа лизиса клеток, а также от условий проведения ПЦР. Поэтому для изучения генетического разнообразия природных микробных сообществ рекомендуется одновременно использовать различные методы выделения суммарной ДНК (табл. 1).

### **Подготовка биологического материала**

Суспензию клеток, фиксированную 80%-ным этанолом, центрифугируют 15–20 мин при 12000 об/мин. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в 100 мкл трис-солевого буфера для выделения ДНК методом ферментативного лизиса (Белькова, 2004) или в 50 мкл ТЕ-буфера для выделения ДНК методом с ЦТАБ (Грачев и др., 2006).

### **Приготовление буферных растворов**

В ежедневной работе удобно использовать растворы хранения и рабочие растворы основных буферов. Растворы хранения – это концентрированные однокомпонентные растворы реагентов с определенным показателем рН, их хранят при комнатной температуре или в холодильнике при +4°C. Рабочие растворы – это многокомпонентные буферные растворы, их готовят непосредственно перед использованием из растворов хранения (табл.2, 3).

### **Молекулярные массы основных реагентов:**

Трис-оксиметиламинометан (трис-основание), ММ = 121,2

NaCl, ММ = 58,4

ЭДТА (динатриевая соль), ММ = 336,2

Ацетат натрия, безводный, ММ = 82,0

Додecilсульфат натрия, ММ = 288,4

**Таблица 1.** Особенности отдельных методов выделения ДНК (Белькова и др., 2008).

Стадия	Наборы фирмы АмплиСенс, Москва	Метод модифицированной очистки с цетавлоном	Метод ферментативного лизиса с фенол-хлороформной экстракцией
Лизис	Лизирующий раствор, рекомендованный фирмой. Лизис при комнатной температуре 20–30 мин.	Лизирующий буфер: 100 мМ трис-НСl, рН 8.0, 1.4 М NaCl, 2% ЦТАБ, 20 мМ ЭДТА. Лизис при 60°С, гомогенизация.	Лизирующий буфер: 10 мМ трис-НСl, рН 7.5, 0.1М NaCl, 2 мМ ЭДТА, 10 мг/мл лизоцима. Лизис при 37°С 30–60 мин, дополнительно – добавление протеиназы К и SDS (до 1%).
Удаление клеточного дебриса	Центрифугирование 10 мин.	Центрифугирование 10 мин.	–
Осаждение ДНК	Добавление сорбента к супернатанту.	–	–
Очистка ДНК от белков и полисахаридов	Обработка сорбента растворами для отмывки согласно инструкции производителя.	Обработка РНКазой и протеиназой К.	Фенол-хлороформная экстракция
Осаждение ДНК	–	Обработка 1% водным ЦТАБ, замораживание-оттаивание. Осадок экстрагируют этанолом, добавляют 3М уксусат натрия.	3 М уксусат натрия, изоамиловый спирт, абсолютный этанол.
Растворение/смыв ДНК	Стерильной дист. водой или РНК-элюэнтом.	Стерильной дист. водой или TE-буфером.	Стерильной дист. водой или TE-буфером.

## **РАСТВОРЫ ХРАНЕНИЯ**

### **Приготовление раствора хранения 1М трис-НСl, pH 7,5**

Навеску триса 12,1 г растворить в 80 мл дистиллированной воды, перемешивая на магнитной мешалке. Оттитровать pH раствора до 7,5 1N соляной кислотой, после чего довести объем в мерной колбе до 100 мл. Профильтровать через 0,22-микронный фильтр в стерильную стеклянную посуду, хранить при +4°C или, для надежности, при -20°C.

### **Приготовление раствора хранения 1М трис-НСl, pH 8,0**

Навеску триса 12,1 г растворить в 80 мл дист. воды, перемешивая на магнитной мешалке. Оттитровать pH раствора до 8,0 1N HCl, далее довести объем в мерной колбе до 100 мл. Профильтровать через 0,22-мкм фильтр в стерильную стеклянную посуду, хранить при +4°C или при -20°C.

### **Приготовление раствора хранения 5М NaCl**

Навеску 29,0 г хлорида натрия растворить, перемешивая на магнитной мешалке, в 95 мл дистиллированной воды, после чего довести объем в мерной колбе до 100 мл. Хранить при комнатной температуре.

### **Приготовление раствора хранения 0,5М ЭДТА, pH 8,0**

Навеску ЭДТА 84 г растворить в 400 мл дист. воды, перемешивая на магнитной мешалке и титруя pH раствора до 8,0 10% NaOH. Довести объем в мерной колбе до 500 мл. Хранить при комнатной температуре.

### **Приготовление раствора хранения 3М ацетата натрия, pH 5,0**

Навеску 24,6 г ацетата натрия растворить в 80 мл дистиллированной воды, перемешивая на магнитной мешалке. Оттитровать раствор до pH 5,0 ледяной уксусной кислотой (работать в вытяжном шкафу!), после чего довести объем раствора до 100 мл в мерной колбе. Профильтровать через 0,22-микронный фильтр в стерильную стеклянную посуду, хранить при +4°C.

## Приготовление раствора хранения 10% SDS

Навеску 10 г SDS растворить в 90 мл дистиллированной воды, перемешивая на магнитной мешалке, довести объем до 100 мл в мерной колбе. Хранить при комнатной температуре. При пониженной температуре 10% SDS выпадает в осадок, который можно растворить, прогрев раствор на водяной бане.

## РАБОЧИЕ РАСТВОРЫ

**Таблица 2.** Приготовление рабочих растворов: трис-солевого и ТЕ-буфера.

Компонент	Требуемый объем	Конечная концентрация
<i>Трис-солевой буфер</i>		
1М трис-НСl, pH 7,5	1 мл	10 мМ трис-НСl, pH 7,5
5М NaCl	2 мл	0,1 М NaCl
0,5М ЭДТА, pH 8,0	0,4 мл	2 мМ ЭДТА
H <sub>2</sub> O	до 100 мл в мерной колбе	
Профильтровать через 0,22-микронный фильтр в стерильную стеклянную посуду, хранить при +4°C.		
<i>ТЕ-буфер</i>		
1М трис-НСl, pH 7,5	1 мл	10 мМ трис-НСl, pH 7,5
0,5М ЭДТА, pH 8,0	0,2 мл	1 мМ ЭДТА
H <sub>2</sub> O	до 100 мл в мерной колбе	
Профильтровать через 0,22-микронный фильтр в стерильную стеклянную посуду, хранить при +4°C. Разлить по 1 мл в стерильные пробирки типа эппендорф и хранить при -20°C.		

## 6.1. Выделение ДНК методом ферментативного лизиса

К 100 мкл клеточной суспензии добавляют 300 мкл трис-солевого буфера (рН 8,0) с лизоцимом (10–20 мг/мл) до конечной концентрации лизоцима 1–10 мг/мл. Лизис ведут 15–60 *мин* при 37°C. Затем добавляют 25 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубируют еще 15–30 *мин* при 60°C. Добавляют 10% SDS до конечной концентрации 1% SDS в растворе и выдерживают 10 *мин* при комнатной температуре. Перед экстракцией белков и полисахаридов можно добавить одну или две стадии замораживания-оттаивания. Для этого материал замораживают при –40°C в течение 30 *мин* и прогревают при 60°C 20 *мин*. Белки и полисахариды экстрагируют фенолом и хлороформом (соблюдать технику безопасности: работать в вытяжном шкафу в перчатках!). Для этого к водной фракции добавляют равный объем фенола, насыщенного трис-HCl (рН 8,0), суспензию взбалтывают 10–15 *мин* и центрифугируют при 12000 *об/мин* 10 *мин*. При такой обработке ДНК-содержащий материал остается в водной фазе, а белки и полисахариды переходят в органическую фазу (фенол). Для дальнейшей работы верхнюю водную фазу отбирают тщательно, не захватывая интерфазу, и далее экстрагируют, как было описано выше, равным объемом смеси фенол-хлороформ (1:1) и центрифугируют 10 *мин* при 12000 *об/мин*. Затем водную фазу обрабатывают таким же образом равным объемом хлороформа. Процедуру обработки хлороформом следует повторить, если водная фаза непрозрачна или наблюдается выраженная интерфаза. После экстракции макромолекул к водной фазе добавляют 1/10 объема 3М ацетата натрия (рН 5,0) и 2 объема абсолютного этанола. ДНК осаждают в течение ночи при –20°C, собирают центрифугированием при 12000 *об/мин*. в течение 30 *мин*. Для удаления солей осадок промывают 400 мкл 70%-ного холодного этанола, который хранят при –20°C, еще раз центрифугируют. Надосадочную жидкость удаляют, осадок подсушивают на воздухе и растворяют в ТЕ-буфере или безбактериальной воде. Хранят растворенную ДНК при –20°C.

## 6.2. Метод очистки ДНК с применением ЦТАБ

Выделение ДНК методом очистки с применением ЦТАБ дает стабильно хороший результат при выделении геномной ДНК из большого количества биомассы. Мы использовали этот метод в модификации М.А. Грачева и соавторов (Грачев и др., 2006).

Для выделения ДНК к 50 мкл клеточной суспензии в ТЕ буфере добавляют 100 мкл лизирующего буфера с ЦТАБ, гомогенизируют 10 *мин* при 60°C, затем добавляют еще 150 мкл этого буфера и выдерживают 30 *мин* при 60°C, периодически перемешивая. Смесь центрифугируют в течение 5 *мин* при 12000 *об/мин*, супернатант переносят в новую пробирку, а осадок промывают 100 мкл лизирующего буфера. Супернатанты объединяют и добавляют 5 мкл протеиназы К (10 мг/мл), смесь инкубируют 30 *мин* при 60°C. Затем добавляют 1 мл 1% водного ЦТАБ, перемешивают и осаждают цетавлоновую соль нуклеиновых кислот с помощью замораживания-оттаивания. Осадок собирают центрифугированием в течение 15 *мин* при 12000 *об/мин*, дважды промывают 300 мкл 1% водного цетавлона. Супернатант удаляют, а осадок подсушивают и экстрагируют этанолом (2 раза по 400 мкл) 10 *мин* при 60°C, отделяя супернатант центрифугированием в течение 30 *мин* при 12000 *об/мин*. К объединенному супернатанту добавляют 80 мкл 3М ацетата натрия (рН 5,0) и выдерживают ночь при низкой температуре (-20°C) для осаждения нуклеиновых кислот. ДНК осаждают центрифугированием при 12000 *об/мин* в течение 30 *мин*, промывают 70%-ным этанолом (см. выше), подсушивают на воздухе и растворяют в ТЕ буфере.

### Приготовление рабочего раствора 1% водного ЦТАБ

По условиям техники безопасности все работы с ЦТАБ необходимо проводить в вытяжном шкафу. Навеску 1 г ЦТАБ растворить в 95 мл дистиллированной воды, перемешивая на магнитной мешалке, довести объем раствора в мерной колбе до 100 мл. Хранить при комнатной температуре. При пониженной температуре в колбе выпадает осадок, который можно растворить, прогрев раствор на водяной бане.

**Таблица 3.** Приготовление рабочего раствора лизирующего буфера с ЦТАБ.

Компонент	Требуемый объем	Конечная концентрация
1М трис-НСl, рН 8,0	10 мл	100 мМ трис-НСl, рН 8,0
5М NaCl	28 мл	1,4 М NaCl
ЦТАБ	2 г	2% ЦТАБ
0,5М ЭДТА, рН 8,0	4 мл	20 мМ ЭДТА
H <sub>2</sub> O	до 100 мл в мерной колбе	

### 6.3. Выделение ДНК с помощью сорбентов

В настоящее время на рынке реактивов для молекулярно-биологических исследований постоянно появляются наборы для выделения ДНК или ДНК/РНК, наборы для очистки ДНК или ПЦР-продуктов. Наиболее распространенными являются наборы для выделения ДНК с помощью сорбентов, одним из вариантов которых являются колонки с сорбентами. В наборах для выделения ДНК используются те же основные этапы очистки ДНК, что и в описанных выше способах:

1 - разрушение клеток лизоцимом или лизирующим буфером, содержащим химические детергенты;

2 - осаждение ДНК на сорбенте, отмывание ДНК от всех макромолекул (полисахариды, белки), которые остаются в растворе;

3 - смыв ДНК с сорбентов.

Одним из вариантов наборов с сорбентами являются наборы российской фирмы Амплисенс (Москва, Россия). Выделение ДНК проводят с помощью наборов ДНК-сорб А и Б, а суммарные препараты нуклеиновых кислот получают с помощью набора РИБО-сорб по прилагаемой к наборам инструкции. К суспензии клеток объемом около 100 мкл добавляют 450 мкл лизирующего буфера, тщательно перемешивают. Если после лизиса мы видим, что в лизате много взвешенных частиц, то перед добавлением сорбента лизирующий раствор обязательно необходимо центрифугировать 10–15 *мин* при 12000 *об/мин*. Надосадочную жидкость после центрифугирования переносят в новую пробирку и добавляют к ней 25 мкл сорбента. Суспензию тщательно суспендируют на вортексе, выдерживают при комнатной температуре 5 *мин*, периодически перемешивая. Центрифугируют 30 *сек* при 12000 *об/мин*, супернатант удаляют. Далее проводят серию отмываний в отмывочных буферах 1 и 3 строго по инструкции. Осадок ресуспендируют в 400 мкл раствора для отмывки 4, центрифугируют 30 *сек* при 12000 *об./мин.*, супернатант удаляют и осадок подсушивают 30 *мин* при 48°C. Осадок можно хранить при комнатной температуре до элюции нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты элюируют в 50 мкл безбактериальной стерильной воды или ТЕ-буфера. Для этого осадок тщательно суспендируют, прогревают в термостате 5 *мин* при 60°C и центрифугируют 5 *мин* при 12000 *об/мин*. Надосадочную жидкость тщательно, без сорбента отбирают в новую пробирку и используют в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Одним из самых широко используемых наборов с колонками является набор для выделения ДНК *QIAamp Blood&tissue* (QIAGEN). Бактериальный осадок или смыв с фильтра суспендируют в 180 мкл трис-солевого буфера (рН 8,0) с лизоцимом (10 мг/мл). Суспензию инкубируют 30 *мин* при 37°C.



Добавляют 25 мкл протеиназы К (100 мг/мл) и далее всю обработку ведут по протоколу: добавляют 200 мкл буфера AL (из набора). Реакционную смесь инкубируют 30 *мин* при 70°C и 30 *мин* при 95°C. После этого добавляют 210 мкл 96%-ного этанола, тщательно перемешивают, наносят на колонку и центрифугируют 1 *мин* на настольной центрифуге при 12000 *об/мин*. Колонку дважды промывают буфером AW (из набора), центрифугируют 1 *мин* при 12000 *об/мин*. Для полного удаления остатков спирта повторяют центрифугирование в течение 3 *мин* при 12000 *об/мин*. ДНК элюируют буфером AE (из набора). Для этого буфер предварительно прогревают при 70°C, наносят 200 мкл горячего буфера на колонку, выдерживают 1–5 *мин* и центрифугируют 5 *мин* при 12000 *об/мин*.

## ГЛАВА 7

### АМПЛИФИКАЦИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА 16S рРНК ИЗ СУММАРНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК

В состав реакционной смеси для проведения полимеразной цепной реакции входят следующие компоненты:

1. Буферный раствор 10 мМ трис-НСl, рН 8,8; 50 мМ КСl;
2. MgCl<sub>2</sub>, концентрацию которого можно варьировать от 1 до 8 мМ (ионы двухвалентного магния необходимы для работы ДНК-полимеразы). Рекомендуемая концентрация для амплификации бактериальной ДНК – 2,5 мМ.;
3. дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ по 0,2–0,4 ммоль каждого. Количество дезоксинуклеотидтрифосфатов зависит от фермента, используемого в реакции. Для реакций с ферментами, обладающими экзонуклеазными (репарационными) активностями (*Tth*, *Vent*, *Pfu* ДНК-полимеразы), желательно подбирать концентрации дезоксинуклеотидтрифосфатов в каждом случае отдельно в зависимости от длины ампликона;
4. Два олигонуклеотида праймера, концентрация каждого по 10 пмоль на 25 мкл реакционной смеси;
5. Количество выделенной суммарной бактериальной ДНК оценивают спектрофотометрически и в полимеразную цепную реакцию берут от 1 до 10 нг ДНК;
6. ДНК-полимераза – в амплификацию берут 1 ед. акт. на 25 мкл реакционной смеси.

Все реактивы для полимеразной цепной реакции хранят при –20°C.

При замешивании амплификации необходимо следовать следующим правилам:

1. После размораживания все реактивы необходимо перемешать на вортексе и осадить на настольной центрифуге на малых оборотах (3000 об/мин, 1 мин) за исключением фермента;

2. Пробирки для амплификации установить в штатив с хладагентом;
3. Добавить все необходимые компоненты, фермент добавляется в последнюю очередь;
4. Выбрать режим реакции, установить пробирки в амплификатор и запустить прибор.

Следует отметить, что при постановке амплификации всегда необходимо ставить контроли. Самый основной – это так называемый безматричный контроль реакции – в этом случае в реакционную смесь добавляют все компоненты, а в качестве матрицы используют воду. Этот контроль всегда должен быть отрицательным, что подтверждает чистоту используемых реагентов. Кроме того, при амплификации на парах групп-специфичных праймеров необходима постановка соответствующих положительных и отрицательных контролей. Эти контроли в качестве матриц подразумевают использование препаратов нуклеиновых кислот тех штаммов, на которых ПЦР-продукт должен быть либо получен обязательно (положительный контроль), либо точно отсутствовать (отрицательный контроль).

### 7.1. Подбор пары праймеров

Пару праймеров для амплификации выбирают в зависимости от поставленной задачи: для изучения максимального разнообразия микробного сообщества рекомендуется использовать пару наиболее консервативных бактериальных праймеров 500L–1350R (позиции по *E.coli* 514–533 и 1407–1389, Денисова и др., 1999).

Проверка этих праймеров с использованием базы данных Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>) показала, что они действительно обладают высокой консервативностью. Нуклеотидные последовательности некоторых групп- и видо-специфичных бактериальных праймеров представлены в таблице 4. Кроме того, в таблице указаны филогенетические

группы, которые могут быть определены с помощью той или иной пары праймеров.

**Таблица 4.** Олигонуклеотидные праймеры на основные филогенетические группы бактерий.

Название пары праймеров	Последовательность 5'-3'	Филогенетическая группа
EUB500L	CGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	Все эубактерии
EUB1350R	GACGGGCGGTGTGTACAAG	
ADF681L	CTGGCTCAGAYCGAACG	Альфа-подгруппа протеобактерий
BET680L	CRCGTGTAGCAGTGA	Бета-подгруппа протеобактерий
CF319L	GTACTGAGACACGGACCA	Цитофаги-Флавобактерии
BLS342L	CAGCAGTAGGGAATCTTC	Грамположительные, бациллы
ACT235L	CGCGGCSTATCAGCTTGTTG	Актинобактерии
PLA930R	CTCCACCGCTGTGTGA	Планктомицеты
ACI31L	GATCCTGGCTCAGAATC	Ацидобактерии
CYA106L	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	Цианобактерии
CYA781R	GACTACTGGGTATCTAATCCCATT	
ACA650L	TAGAGTATGGGAGAGGAT	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

## 7.2. Подбор оптимальных условий амплификации

Для оценки оптимальных условий амплификации необходимо определить следующие параметры реакции (1) концентрацию матричной ДНК; (2) температуру отжига и (3) количество циклов. Для амплификации используют следующие концентрации суммарной бактериальной ДНК: 0,01; 0,1; 1 и 10 мкг/мл. Для выявления оптимальной температуры отжига амплификацию ведут с градиентом температур от 50 до 72°C. Количество циклов можно изменять от 20 до 45.

Кроме того, следует учитывать, с каким конкретно ферментом проводится амплификация. В настоящее время наряду с обычными термофильными *Taq* ДНК-полимеразами широко используются ДНК-

полимеразы, обладающие репарационными активностями, такие как Vent(exo<sup>+</sup>) или *Pfu* ДНК-полимеразы. Эти полимеразы за счет 3'-5' - экзонуклеазной активности обеспечивают более высокую точность амплификации и низкую частоту ошибок, по сравнению с остальными термостабильными ДНК-полимеразами, но требуют дополнительного подбора условий амплификации. Для получения качественного ПЦР-продукта с этими полимеразами кроме вышеперечисленных параметров, следует учитывать длину амплифицируемого фрагмента и увеличивать концентрацию дНТФ.

Для получения максимального разнообразия ПЦР-продуктов рекомендуется использовать следующий режим реакции (Денисова и др., 1999):

94°C – 5 мин, 50°C – 2 мин, 72°C – 2 мин (1 цикл),  
92°C – 45 сек, 52°C – 1,2 мин, 72°C – 1,5 мин (2–10 циклы),  
92°C – 45 сек, 54°C – 1,2 мин, 72°C – 1,5 мин (11–20 циклы),  
92°C – 45 сек, 56°C – 1,2 мин, 72°C – 1,5 мин (21–30 циклы),  
72°C – 20 мин (31 цикл).

Амплификацию на групп-специфичных праймерах проводят в следующем режиме реакции:

**денатурация** – 94°C, 45 сек;

**отжиг** – температура варьирует в зависимости от конкретной пары праймеров, 45 сек;

**элонгация** – 72°C, 70 сек .

В первом цикле матрицу денатурируют 5 мин, а в последнем - время элонгации увеличивают до 20 мин. Всего проводят 30 циклов амплификации. Следует отметить, что время элонгации при амплификации протяженных фрагментов (длиной более 1000 п.н.) может быть увеличено до 1,5–2 мин.

### 7.3. Очистка ПЦР-продукта

В биохимических исследованиях для фракционирования макромолекул (белков и нуклеиновых кислот) используют электрофорез на разных носителях – крахмальных, агаровых, агарозных и полиакриламидных гелях (Гааль и др., 1982). Наиболее употребимыми из них являются полиакриламидный и агарозный гели. Этим гелям присуще свойство молекулярного сита, благодаря чему в них можно разделять нуклеиновые кислоты с различной величиной ММ. С их помощью можно определить не только величину ММ анализируемого фрагмента ДНК, но и установить, состоит ли данная молекула из одной или двух полинуклеотидных цепей, а также определить форму молекулы ДНК – линейную или кольцевую.

Наиболее предпочтительной поддерживающей средой при электрофорезе нуклеиновых кислот являются агарозные гели. Незаменимыми их делает сочетание прочности и крупнозернистости. Агароза – это особая чистая фракция агара, являющегося смесью природных линейных полисахаридов, который извлекают из некоторых морских водорослей. Растворы агарозы застывают, образуя гели при температурах 36–42°C. При температурах 84–96°C агароза из геля переходит в прозрачную жидкость – «плавится».

Электрофорезом в агарозе в большинстве случаев разделяют отрицательно заряженные частицы, мигрирующие к аноду. Выбор концентрации агарозы, определяющей размер пор агарозного геля, зависит от размеров фракционируемых молекул ДНК (табл. 5).

На разделение нуклеиновых кислот в агарозе помимо величины молекулярной массы ДНК и концентрации агарозы влияют и другие факторы. Так, одноцепочечные высокомолекулярные молекулы ДНК можно разделять в 0,6%-ном агарозном геле при условии, что разница в ММ между молекулами составляет не менее 5 %. Подвижность же двухцепочечных молекул ДНК почти не зависит от их ММ. В 2%-ном агарозном геле

нуклеиновые кислоты разделяются, главным образом, в соответствии с величинами их ММ. ПЦР-продукты после амплификации анализируют, как правило, электрофорезом в 1% или 1,5% агарозном геле в 0,5×ТАЕ буфере.

**Таблица 5.** Эффективный размер фрагментов линейной ДНК для разделения в геле, содержащем различное количество агарозы (Sambrook et al., 1989).

<b>Количество агарозы в геле (% , вес/об)</b>	<b>Длина фрагментов линейной ДНК (<math>\times 10^3</math> п.н.)</b>
<b>0,3</b>	<b>5–60</b>
<b>0,6</b>	<b>1–20</b>
<b>0,7</b>	<b>0,8–10</b>
<b>0,9</b>	<b>0,5–7</b>
<b>1,2</b>	<b>0,4–6</b>
<b>1,5</b>	<b>0,2–3</b>
<b>2,0</b>	<b>0,1–2</b>

При фракционировании ДНК (фрагментов ДНК) важно правильно оценить ММ исследуемых молекул. Для этой цели в отдельном треке проводят разделение молекул такого же типа с известными значениями ММ и далее сопоставляют положение полосы исследуемой НК в параллельном треке с расположением полос маркерного набора. Для РНК для этой цели используют тРНК, 5S РНК, рибосомные и другие РНК известного размера. Для ДНК роль маркеров обычно выполняет набор фрагментов известной длины, полученный при расщеплении известной ДНК определенными рестриктазами. Таковы, например, наборы рестриктов ДНК фага  $\lambda$ , получающиеся при расщеплении ее рестриктазами Hind III или Eco RI - порознь или совместно.

В качестве лидирующих красителей при электрофорезе нуклеиновых кислот используют бромфеноловый синий и ксиленцианол (табл.6).

**Таблица 6.** Приготовление раствора красителя БФС, используемого при нанесении ПЦР-продуктов в гель.

Компонент	Требуемый объем	Конечная концентрация
2% БФС	20 мкл	0,04%
глицерин	100 мкл	10%
0,5М ЭДТА, рН 8,0	200 мкл	0,1 М
H <sub>2</sub> O	до 1 мл	

После электрофореза гель окрашивают бромистым этидием (рабочая концентрация 2 мкг/мл) для визуализации продуктов амплификации в УФ-свете. Следует учитывать жесткость УФ-лучей: чем мягче УФ-свет (выше длина волны), тем меньше он разрушает структуру ДНК. Полосы, соответствующие по размеру вставкам фрагмента гена 16S рРНК, вырезают при УФ-свете с длиной волны 312 нм и проводят очистку ПЦР-продуктов с помощью коммерческих наборов или элюцией. Для элюции нуклеотидного материала фрагменты геля помещают в стерильные пробирки эппендорф, замораживают при  $-20^{\circ}\text{C}$ , а затем центрифугируют 15 мин на настольной центрифуге при максимальных оборотах. Супернатант, содержащий ПЦР-продукт, отбирают и используют для лигирования или секвенирования.

### **Приготовление раствора хранения 50×ТАЕ буфера**

Навеску 121 г трис-основного растворить в 400 мл дистиллированной воды, перемешивая на магнитной мешалке. Оттитровать рН раствора до 7,6 ледяной уксусной кислотой, после чего добавить 50 мл 0,5М ЭДТА (рН 8,0) и довести объем в мерной колбе до 500 мл. Хранить при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Рабочий раствор 0,5×ТАЕ готовится непосредственно перед использованием.

*50×ТАЕ буфер:*

М трис-ацетат, рН 7,6,

50 мМ ЭДТА



## ГЛАВА 8

### ЛИГИРОВАНИЕ ПЦР-ПРОДУКТА В ПЛАЗМИДНЫЕ ВЕКТОРА

Для лигирования ПЦР-продукта принято использовать плазмидные вектора. Плазмидный вектор представляет собой фрагмент плазмиды, содержащий область начала репликации, ген устойчивости к антибиотику (чаще всего к ампициллину) и генетический маркер для селекции клонов. Наиболее широко используемые наборы фирм Promega и Fermentas. ПЦР-продукты, полученные с помощью *Taq* ДНК-полимеразы, используют обычно в АТ-лигировании. Для клонирования ПЦР-продуктов, полученных с помощью ДНК-полимераз с репарационными активностями, в последнее время применяют наборы для тупоконечного лигирования. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки. Например, в случае АТ-клонирования амплификационную смесь можно использовать в реакцию лигирования, без дополнительной очистки, но при этом количество колоний, содержащих плазмиду со вставкой, варьирует от 30 до 60% от общего числа выросших колоний. В случае тупого клонирования необходимо обязательно проводить очистку ПЦР-продукта, но при этом количество колоний, содержащих плазмиду со вставкой нужной длины, увеличивается.

#### 8.1. Лигирование ПЦР-продуктов с липкими концами

Для клонирования ПЦР-продуктов, содержащих фрагмент гена 16S рРНК, используют такие плазмиды как pAT123 (ClonTech), pGEM-AT (Promega), pJET-AT (Fermentas). В реакцию берут 50 нг плазмидного вектора и 1–3 мкл неочищенного ПЦР-продукта. Лигирование проводят в 10 мкл реакционной смеси, содержащей лигазный буфер и 1 ед. акт. T4 ДНК-лигазы соответствующей фирмы-производителя. Смесь инкубируют от 12 до 24 часов при 14°C и используют для трансформации.

## 8.2. Лигирование ПЦР-продуктов с тупыми концами

Новый набор GeneJET™ PCR Cloning Kit компании Fermentas предназначен для тупого лигирования. ПЦР-продукты с тупыми концами, полученными с помощью корректирующих ДНК-полимераз, могут быть сразу же лигированы с вектором для клонирования pJET/blunt. ПЦР-продукты с 3'-дА выступающим концом, полученные с помощью *Taq* ДНК-полимеразы или другими термостабильными ДНК-полимеразами, затуляются с помощью высоко эффективного термостабильного фермента ДНК-blunting (термостабильный фрагмент Клёнова ДНК-полимеразы I *E.coli*) перед лигированием. Реакционный буфер для этой реакции оптимизирован как для реакции «затупления» концов, так и для реакции лигирования. Оптимальное молярное отношение вставка:вектор – 3:1.

Реакцию «затупления» концов ПЦР-продуктов, полученных с помощью *Taq* ДНК-полимеразы, проводят в лигазном буфере, поставляемом фирмой-производителем, добавляют 1–2 мкл очищенного ПЦР-продукта и 1 мкл фермента DNA-blunting. Смесь тщательно перемешивают, центрифугируют 3–5 сек и инкубируют при температуре 70°C в течение 5 мин. Охлаждают во льду несколько секунд и сразу же ставят реакцию лигирования, добавляя 50 нг вектора pJET/blunt и 1 мкл T4 ДНК-лигазы. Реакционную смесь тщательно перемешивают, центрифугируют 3–5 сек и инкубируют 30 мин при комнатной температуре (22°C). После этого смесь можно использовать для трансформации клеток *E.coli*.

## ГЛАВА 9

### ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК *Escherichia coli*

#### 9.1. Приготовление компетентных клеток

Компетентные клетки *E.coli* (штаммы Inv $\alpha$ , JM-109, XL-1) для трансформации получают, используя методику трансформации CaCl<sub>2</sub>-зависимых клеток (Sambrook et al., 1989). Клетки *E.coli* поддерживают и хранят в холодильнике на чашках с минимальной средой M9. Для получения ночной культуры 2–3 отдельные колонии засевают в 50 мл среды SOB и инкубируют до титра 4–7×10<sup>7</sup> жизнеспособных клеток в 1 мл среды при постоянном перемешивании. Для определения титра жизнеспособных клеток используют колориметр КФК-2-УХЛ 4.2 (Россия). Значения оптической плотности и титр жизнеспособных клеток, до которых наращивают биомассу для приготовления компетентных клеток, обычно зависят от конкретного штамма, используемого в работе. Важным условием является использование клеток на определенной стадии роста, а именно в поздней логарифмической фазе роста. Клетки штаммов Inv $\alpha$  и JM-109 выращивают при 37°C до оптической плотности 0,22–0,3 (длина волны 590 нм, кювета 1 см), клетки штамма XL-1 выращивают при 18–25°C до оптической плотности 0,6–1,0.

Далее все процедуры с клетками *E.coli* проводят во льду. Компетентные клетки можно готовить в большом объеме (100–200 мл), замораживать и хранить при –70°C. Такие клетки сохраняют способность к трансформации в течение года. Однако если нет возможности хранить клетки, их можно готовить в микроколичествах (1,5 мл) и использовать для трансформации в день приготовления.

#### Приготовление компетентных клеток для хранения

После достижения требуемой оптической плотности клетки (250 мл среды) охлаждают в течение 10 мин в ледяной бане и центрифугируют 15

*мин* на центрифуге РС-6 (Россия) при 3000 *об/мин* и 4°C. После центрифугирования в стерильных условиях супернатант сливают, клетки промывают 80 мл охлажденным во льду ТВ буфера (10 мМ MOPS, 55 мМ MnCl<sub>2</sub>, 15 мМ CaCl<sub>2</sub>, 250 мМ KCl), выдерживают 10 *мин* в ледяной бане и центрифугируют 15 *мин* при аналогичных условиях. Супернатант сливают, клетки ресуспендируют в 20 мл ТВ буфера и, медленно перемешивая, добавляют ДМСО до конечной концентрации 7%, инкубируют 10 *мин* в ледяной бане. Рекомендуется ДМСО добавлять в два приема, каждый раз выдерживая клетки в ледяной бане 15 *мин*. Затем клеточную биомассу разделяют на аликвоты по 200 мкл, замораживают и хранят при -70°C.

### **Приготовление компетентных клеток без замораживания**

Клеточную суспензию (1,5 мл) охлаждают 10–15 *мин* во льду, центрифугируют на настольной центрифуге 30 *сек* (10000 *об/мин*). Супернатант сливают, а клетки, мягко перемешивая, промывают в 500 мкл охлажденного ТВ буфера и инкубируют 10–15 *мин*. Клеточную суспензию вновь центрифугируют 30 *сек* (10000 *об/мин*), ресуспендируют в 120 мкл ТВ буфера, и дважды добавляют по 4,2 мкл ДМСО в толщу суспензии, выдерживая смесь каждый раз по 15 *мин* во льду.

Минимальная среда M9 (Sambrook et al., 1989)

0,6 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,3 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,05 г NaCl

0,1 г NH<sub>4</sub>Cl

1,5 г агар

Вода до 100 мл

Стерилизуются отдельно и добавляются в стерильных условиях:

0,2 мл 1М MgSO<sub>4</sub>

0,1 мл 1М CaCl<sub>2</sub>

1 мл 20% глюкозы

Среда SOB (Sambrook et al., 1989)

1 г триптон

0,25 г дрожжевой экстракт

250 мкл 2М NaCl

62,5 мкл 2М KCl

Вода до 50 мл

Отдельно стерилизуются и добавляются в стерильных условиях:

0,5 мл 1М MgCl<sub>2</sub>

0,5 мл 1М MgSO<sub>4</sub>

## 9.2. Тепловой шок и собственно трансформация

Для трансформации в каждую пробирку с компетентными клетками добавляют по 3 мкл лигазной смеси, тщательно перемешивают, выдерживают 30 *мин* в ледяной бане и после этого проводят «тепловой шок»: пробирки инкубируют на водяной бане при 42°C 90 *сек*, после чего сразу же охлаждают во льду в течение 2 *мин* и в каждую пробирку добавляют по 800 мкл среды SOC. Для «оживления» клеток, а именно для восстановления клеточной стенки, суспензию инкубируют 45–60 *мин* при 37°C. Для белоголубого скрининга колоний, полученных после трансформации клеток лигазной смесью после АТ-лигирования, клетки высевают на чашки Петри с твердой средой LB, содержащей 20 мкг/мл ампициллина и 0,0005% X-gal. Для скрининга колоний после тупого лигирования в вектор pJET/blunt клетки высевают на чашки Петри с твердой средой LB, содержащей 20 мкг/мл ампициллина. Чашки и в том, и в другом случае инкубируют ночь при 37°C.

Среда SOC (Sambrook et al., 1989)

50 мл среды SOB

В стерильных условиях добавляют 0,5 мл 20% глюкозы

Среда LB (Sambrook et al., 1989)

0,5 г дрожжевой экстракт

1 г триптон

1 г NaCl

1,5 г агар

Вода до 100 мл

### **9.3. Прямая селекция клонов, содержащих вставку ПЦР-продукта**

Отбор клонов, полученных после АТ-лигирования, проводится методом «бело-голубого» скрининга (Sambrook et al., 1989). Отбирают все колонии белого цвета, подразумевая, что они несут плазмиду со вставкой.

Набор GeneJET™ PCR Cloning Kit компании Fermentas для тупого лигирования – это система высоко эффективной положительной селекции трансформантов на основе летального гена эндонуклеазы рестрикции. Лигирование фрагмента ДНК в клонируемое положение разрывает этот летальный ген. В этом случае все выросшие колонии несут плазмиду со вставкой.

## ГЛАВА 10

### ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Выделение плазмидной ДНК проводят методом щелочного лизиса. Для этого клетки выращивают в жидкой среде LB с ампициллином при 37°C в течение ночи. Клеточную биомассу охлаждают 15–20 мин в холодильнике, центрифугируют и суспендируют в 100 мкл буфера с β-МЕ (табл.7).

**Таблица 7.** Приготовление рабочего раствора буфера с β-меркаптоэтанолом.

Компонент	Требуемый объем	Конечная концентрация
1М трис-НСl, рН 8,0	2 мл	20 мМ трис-НСl, рН 8,0
17,8 М β-меркаптоэтанол	56 мкл	10 мМ β-меркаптоэтанол
0,5М ЭДТА, рН 8,0	0,4 мл	2 мМ ЭДТА, рН 8,0
H <sub>2</sub> O	до 100 мл в мерной колбе	

Добавляют 2 мкл этого же буфера с лизоцимом (концентрация 5 мг/мл) и 1 мкл 1% тритона X-100 (в воде). Смесь инкубируют 30 мин во льду. Добавляют 200 мкл 1% SDS в 0,2М NaOH и инкубируют еще 15 мин при комнатной температуре. Добавляют 150 мкл 3М ацетата натрия (рН 4,8–5,0), выдерживают 1 час во льду, центрифугируют 5 мин при 12000 об/мин, осадок удаляют палочкой. К супернатанту добавляют 900 мкл абсолютного этанола, выдерживают 1–2 часа при –20°C, центрифугируют 5 мин (12000 об/мин), надосадочную жидкость удаляют. Осадок растворяют в 100 мкл воды, добавляют 100 мкл 5М LiCl в 50 мМ трис-НСl (рН 8,0) и инкубируют 15 мин во льду. Раствор центрифугируют 5 мин на настольной центрифуге (12000 об/мин), супернатант переносят в новую пробирку, добавляют 500 мкл абсолютного этанола и осаждают плазмидную ДНК 1–2 часа при –20°C. Раствор снова центрифугируют 5 мин (12000 об/мин), супернатант сливают, а осадок растворяют в 50 мкл ТЕ буфера.

Плазмидная ДНК, выделенная этим методом, всегда содержит небольшое количество геномной бактериальной ДНК, поэтому амплификацию встроенного фрагмента следует проводить на универсальных плазмидных праймерах. Кроме того, плазмидная ДНК может быть использована для скрининга клонов, содержащих вставку, рестрикционным анализом.

- Для быстрого скрининга большого числа колоний мы используем метод «кипячения» клеток. Для этого биомассу клеток отобранных колоний переносят в пробирки эппендорф, содержащие 20 мкл 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), суспензию клеток кипятят 5 *мин*, а затем замораживают. Такой лизат клеток после центрифугирования (15 *мин*, 12000 *об/мин*) можно сразу использовать в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции на плазмидных праймерах.

- Для скрининга клонов, содержащих вставку, проводят ПЦР с 1 мкл лизата «кипяченных» клеток, используя праймеры, комплементарные специфичным участкам плазмиды в районе вставки. Структуры праймеров зависят от вектора, используемого для лигирования ПЦР-продукта, и их необходимо уточнять в соответствующем протоколе. Условия реакции следующие:

94°C – 2 *мин* (1 цикл),

92°C – 45 *сек*, 55°C – 45 *сек*, 72°C – 60 *сек* (2–30 циклы),

72°C – 15 *мин* (31 цикл).

Полученные продукты реакции анализируют электрофорезом в 1,5% агарозном геле. После окрашивания геля бромистым этидием полосы, соответствующие по размерам вставкам фрагмента гена 16S рРНК, вырезают и замораживают. Для элюции нуклеотидного материала таблетки геля центрифугируют, жидкость отбирают и используют для секвенирования, рестрикционного анализа или гибридизации.



## **ГЛАВА 11**

### **ПОДГОТОВКА ПРЕПАРАТОВ ПЦР-ПРОДУКТОВ К СЕКВЕНИРОВАНИЮ**

Для успешного проведения реакции секвенирования желательнее, чтобы ПЦР-продукты были получены на той же паре праймеров, с которых будет проводиться сама реакция секвенирования. Для секвенирования на автоматическом секвенаторе ПЦР-продукты должны быть очищены от меченых аналогов, которые были использованы в реакции. Для этого ПЦР-продукты либо осаждают из реакционной смеси этанолом, либо проводят анализ и очистку из агарозного геля, как было описано выше (см. п. 3.3.).

## **ГЛАВА 12**

### **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

Анализ полученных последовательностей проводят путем их сравнения с последовательностями, зарегистрированными в одной из международных баз данных. В результате сотрудничества между GenBank, EMBL и DDBJ, к началу 90-х годов был создан общий международный банк данных опубликованных нуклеотидных последовательностей (INSD) как культивируемых, так и некультивируемых микроорганизмов. Для этого используют пакеты программ FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>) или BLAST (<http://www2.ebi.ac.uk/blast2>).

Следующим шагом при анализе генетического разнообразия смешанных микробных популяций является обязательная проверка полученных нуклеотидных последовательностей на наличие химерных структур. Химеры – это искусственные нуклеотидные последовательности, полученные от двух или более филогенетически отличных матричных ДНК во время полимеразной цепной реакции. Эти последовательности образуются в

результате неспецифической регибридации не полностью удлинённых на предыдущем цикле амплификации цепей ДНК с «неродной» ДНК и разные участки в таких молекулах принадлежат разным микроорганизмам.

Несомненно, что они получаются при амплификации с имеющегося в составе популяции геномного материала, однако для филогенетического анализа подобные последовательности использовать нельзя. В настоящее время существует несколько пакетов программ, позволяющих выявить химерные последовательности. При этом можно провести анализ последовательностей с имеющейся базой данных с помощью пакета программ CHECK CHIMERA (<http://rdp8.cme.msu.edu/html/analyses.html>) или провести поиск химерных молекул среди набора полученных последовательностей с помощью пакета программ Mallard или Bellerophon (<http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl>).

Для филогенетического анализа необходимо выбрать нуклеотидные последовательности не только ближайших родственников, найденных с помощью сравнительного анализа, но и представителей ближайших и основных таксономических групп. Для выравнивания набора таких последовательностей используют программу ClustalW, далее выровненные последовательности проверяют и корректируют с помощью программы Bioedit, а для построения филогенетических древ используют пакеты программ Mega v3.1, PAUP или ARB.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белькова Н.Л., Денисова Л.Я., Манакова Е.Н., Зайчиков Е.Ф., Грачев М.А. Видовое разнообразие глубоководных микроорганизмов озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК // Докл. РАН. 1996. Т. 348. №5. С. 692-695.
2. Белькова Н.Л., Парфенова В.В., Косторнова Т.Я., Денисова Л.Я., Зайчиков Е.Ф. Характеристика биоразнообразия микробного сообщества водной толщи озера Байкал // Микробиология. 2003. Т. 72. №2. С. 239-249.
3. Белькова Н.Л. Таксономическое разнообразие микробного сообщества водной толщи озера Байкал // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Владивосток: ДВГУ, 2004. 20 с.
4. Белькова Н.Л., Парфенова В.В., Сулова М., Ан Т.С., Тадзаки К. Биоразнообразие и активность микробного сообщества горячего источника Котельниковский (оз. Байкал) // Известия РАН (серия Биологическая). 2005. Т. 32. №6. С. 664–671.
5. Белькова Н.Л., Дзюба Е.В., Суханова Е.В. Молекулярно-генетическая детекция непатогенного генотипа *Spironucleus barkhanus* (Diplomonadida: Hexamitidae) в черном байкальском хариусе (*Thymallus arcticus baikalensis* Dybowski, 1874) // Известия РАН. Серия биологическая. 2008а. Т.35. №2. С. 253–256.
6. Белькова Н.Л., Дзюба Е.В., Суханова Е.В., Ханаева Т.А. Адаптация методов молекулярно-генетического анализа для изучения микроорганизмов, ассоциированных с рыбами // Биология внутренних вод. 2008б. №2, С. 91–94.
7. Гааль Э., Медьешти Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир. 1982. 448с.

8. *Грачев М.А., Кузнецова С.Ю., Щербакова Т.А.* Метод выделения высокоочищенной ДНК для использования в полимеразной цепной реакции // Молекулярная биология. 2006. Т. 40. № 1. С. 180–183.
9. *Денисова Л.Я., Белькова Н.Л., Тулохонов И.И., Зайчиков Е.Ф.* Биоразнообразие бактерий на различных глубинах южной котловины озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК // Микробиология. 1999. Т. 68. №4. С. 475-483.
10. *Лаптева Н.А., Белькова Н.Л., Парфенова В.В.* Пространственное распределение и видовой состав простекобактерий в оз. Байкал // Микробиология. 2007. Т. 76. №4. С. 545–551.
11. *Льюин Б.* Гены. М.: Мир. 1987. 544 с.
12. *Маниатис Е., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984. 480 с.
13. *Патрушев Л.И.* Искусственные генетические системы. Т.1: Генная и белковая инженерия. М.: Наука. 2004. 526 с.
14. *Рыбакова И.В., Белькова Н.Л., Лаптева Н.А., Суханова Е.В.* Адаптация молекулярно-генетических методов для изучения таксономического разнообразия микробных сообществ, ассоциированных с макрофитами // Биология внутренних вод. 2009. №1. С. 102-111.
15. *Щелкунов С.Н.* Генетическая инженерия: Учебно-справочное пособие. Новосибирск: Сиб.унив.изд-во. 2004. 496 с.
16. *Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A.* Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations // Appl. Environ. Mikrobiol. 1990a. Vol. 56. P.1919- 1925.
17. *Amann R.I., Krumholz L., Stahl D.A.* Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology// J.Bacteriol. 1990b. Vol. 172. P.762 – 770.

18. *Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H.* Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // *Microbiological Reviews*. 1995. Vol. 59. P. 143 – 169.
19. *Anzai Y., Kim H., Park J.-Y., Wakabayashi H., Oyaizu H.* Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence // *Int. J. Syst. Evol. Mikrobiol.* 2000. Vol. 50. P. 1563 – 1589.
20. *Bahr M., Hobbie J. E., Sogin M.L.* Bacterial diversity in an arctic lake a freshwater SAR 11 cluster // *Aquat. Mikrob. Ecol.* 1996. Vol. 11. P. 271 – 277.
21. *Blackstone G.M., Nordstrom J.L., Vickery M.C.L., Bowen M.D., Meyer R.F., DePaola A.* Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR // *J. Microbiol. Methods*. 2003. Vol.53. P. 149–155.
22. *Borneman J., Triplett E.W.* Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. Vol. 63. P. 2647 – 2653.
23. *Bruce I.J.* Nucleic acid amplification mediated microbial identification // *Science Progress*. 1993. Vol. 77. P. 183 – 206.
24. *Chandler D.P., Fredrickson J.K., Brockman F.J.* Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries // *Mol. Ecol.* 1997. Vol. 6. P. 475 – 482.
25. *Courtois S., Cappellano C.M., Ball M., Francou F. -X., Normand P., Helynck G., Martinez A., Kolvek S.J., Hopke J., Osburne M.S., August P.R., Nalin R., Guerineau M., Jeannin P., Simonet P., Pernodet J.-L.* Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69. P. 49 – 55.

26. *DeLong E.F., Wickham G.S., Pace N.R.* Phylogenetic stains: ribosomal RNA – based probes for the identification of single cells // *Science*. 1989. Vol. 243. P. 1360 – 1363.
27. *Ehrich S., Behrens D., Lebedeva H., Ludwig W., Bock E.J.* A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite – oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship // *Arch. Microbiol.* 1995. Vol. 164. P. 16 - 23.
28. *Ellis R.J., Morgan P., Weightman A.J., Fry J.C.* Cultivation – dependent and – independent approaches for determining bacterial diversity in heavy – metal – contaminated soil // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69.P. 3223 -3230.
29. *Fang Q., Brockmann S., Botzyenhart K., Wiedenmann A.* Improved detection of *Salmonella* spp. In food by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA probes: a comparison with conventional culture methods // *J. Food Prot.* 2003.Vol. 66. P. 723 – 731.
30. *Garcia – Martinez J., Acinas S.G., Anton A.I., Rodrigues -Valera F.* Use of the 16S – 23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity // *J. Microbiol. Methods.* 1999. Vol. 36. P. 55 – 64.
31. *Giovannoni S.J., Turner S., Olsen G.J., Barns S., Lane D.J., Pace N.R.* Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts // *Bacteriol.* 1988a. Vol. 170.P. 3584 – 3592.
32. *Giovannoni S.J., DeLong E.F, Olsen G.J., Pace N.R.* Phylogenetic group – specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells // *J. Bacteriol.* 1988b. Vol. 170. P. 720 – 726.
33. *Giovannoni S.J., Britschgi T.B., Moyer C.L., Field K.G.* Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton // *Nature.* 1990. Vol. 345.P. 60 – 63.
34. *Gloeckner F.O., Amann R., Alfreider A., Pernthaler J., Psenner R., Trebesius K., Schleifer K.-H.* An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria // *Syst. Appl. Microbiol.* 1996. Vol. 19. P. 403 – 406.

35. *Gloeckner F.O., Fuchs B.M., Amann R.* Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. Vol. 65. P. 3721 – 3726.
36. *Glockner O., Zaichikov E., Belkova N., Denissova L., Pernthaler A., Amann R.* Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. Vol. 66. P. 5053 – 5065.
37. *Gray N.D., Head I.M.* Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria // *environ. Microbiol.* 2001. Vol. 3. P.481 – 492.
38. *Henz S.R., Huson D.H., Auch A.F., Nieselt – Struwe K., Schuster S.C.* Whole – genome prokaryotic phylogeny // *Bioinformatics.* 2004.doi: 10.1093 / bioinformatics / bth 324.
39. *Holt L.J., Herring C., Jespers L.S., Woolven B.P.* Domain antibodies: Proteins for thearapy // *Trends Biotechnol.* 2003. Vol.21. P.484-490.
40. *Huang C.Y., Garcia J.L., Patel B.K., Cayol J.L., Baresi L., Mah R.A.* *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis* subsp.nov., a halotolerant facultative anaerobe from Death Valley, and emended description of *Salinivibrio costicola* // *Int.J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000.Vol. 50.P. 615 – 622.
41. *Kita–Tsukamoto K., Oyaizu H., Nanba K., Simidu U.* Phylogenetic relationship of marine bacteria, mainly members of the family Vibrionaceae, determined on the basis of 16S rRNA sequences // *Int. J.Syst. Bacteriol.* 1993. Vol. 43. P. 8 – 19.
42. *Kramer K., Hock B.* Recombinant antibodies for environmental analysis // *Anal.Bioanal.Chem.* 2003. Vol.377. P.417-426.
43. *Kuske C.R., Barns S.M., Busch J.D.* Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions // *Appl. Environ.Microbiol.*1997. Vol. 63.P. 3614 – 3621.
44. *Lane D.J., Stahl D.A., Olsen G.J., Heller D.J., Pace N.R.* Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 163. P. 75 – 81.

45. *Lecerf J.-M., Shirley T.L., Zhu Q. et al.* Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ huntingtin aggregation in cellular models of Huntington's disease // *Ibid.*, 2001. Vol.98. P.4764-4769.
46. *Ludwig W., Bauer M., Held I., Kirchhof G., Schulze R., Huber I., Spring S., Hartmann T., Schleifer K.H.* Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum // *FEMS Microbiol. Lett.* 1997. Vol. 153 .P.181-190.
47. *Macario A.J.L., De Macario C.E., Schoberth S.M., Sahn H.* Shifts in methanogenic subpopulation measured with antibody probes in a fixed-bed loop anaerobic bioreactor treating sulfite evaporator condensate// *Appl. Environ. Microbiol.* 1989. Vol. 55.P.1996-2001.
48. *Mankin A.S., Kagramanova V.K., Teterina N.L., Rubtsov P.M., Belova E.N., Kopylov A.M., Baratova L.A., Bogdanov A.A.* The nucleotide sequence of the gene coding for the 16S rRNA from the archaeobacterium *Halobacterium halobium* // *Gene.* 1985. Vol.37(1-3). P.181-189.
49. *Olsen G.J., Pace N.R., Nuell M., Kaine B.P., Gupta R., Woese C.R.* Sequence of the 16S rRNA gene from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* and its evolutionary implications// *J. Mol. Evol.* 1985. Vol. 22. P. 301-307.
50. *Romaniuk P.J., Zoltowska B., Trust T.J., Lane D.J., Olsen G. J., Pace N.R., Staht D.A.* *Campilobacter pilori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campilobacter* sp.// *J. Bacteriol.* 1987. Vol. 169. P. 2137-2141.
51. *Rondon M.R., August P.R., Bettermann A.D., Brady S.F., Grossman T.N., Liles M.R., Lioacono K.A., Lynch B.A., Macneil I.A., Minor C., Tiong C.L., Gilvan M., Osburne M.S., Clardy J., Handelsman J., Goodman R.M.* Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms// *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. Vol. 66. P.2541-2547.



52. *Palleroni N.J. Genus I. Pseudomonas* Migula 1984// *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*// Edited by Krieg N.R. and Holt J.G. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. Vol. 1. P. 141-199.
53. *Pernthaler J., Gloeckner F.O., Unterholzner S., Alfreider A., Psenner R., Amann R.* Seasonal community and population dynamics of pelagic Bacteria and Archaea in a high mountain lake// *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. Vol. 64. P. 4299-4306.
54. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular Cloning. A laboratory Manual* // Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Vol. 1, 2, 3.
55. *Schloss P.D., Hay A.G., Wilson D.B., Gossett J.M., Walker L.P.* Quantifying bacterial population dynamics in compost using 16S rRNA gene probes//*Appl. Microbiol. Biotech.* 2005. Vol. 66. P. 457-463.
56. *Snaidr J., Amann R., Huber I., Ludwig W., Schleifer K.-H.* Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge// *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. Vol. 63. P. 2884-2896.
57. *Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J., Pace N.R.* Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences// *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. Vol. 49. P. 1379-1384.
58. *Stahl D.A., Flesher B., Mansfield H.R., Montgomery L.* Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology// *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. Vol. 54. P. 1079-1084.
59. *Steinberger P., Andris-Widhopf J., Buhler B. et al.* Functional deletion of the CCR5 receptor by intracellular immunization produces cells that are refractory to CCR5-dependent HIV-1 infection and cell fusion // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97. P. 805-810.
60. *Thoerner P., Bin Kigombe C.I., Bogli-Chosat B., Wassenaar T.M., Frey J., Jemmi T.* PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69. P. 1810-1816.

61. *Thompson F.L., Hoste B., Thompson C.C., Goris J., Gomez-Gil B., Huys L., De Vos P., Swings J.* *Enterovibrio norvegicus* gen. nov., sp.nov., isolated from the gut of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae: a new member of the family *Vibrionaceae*// *Int.J.Syst. Evol. Microbiol.* 2002. Vol.52.P. 2015-2022.
62. *Thompson F.L., Thompson C.C., Li Y., Gomez-Gil B., Hoste B., Vandenberghe J., Swings J.* *Vibrio kanaloae* sp. Nov., *Vibrio pomeroyi* sp.nov. and *Vibrio chagasii* sp. Nov., from sea water and marine animals // *Int. J.Syst. Evol.Microbiol.* 2003. Vol. 53. P. 753 – 759.
63. *Turner S., Burger – Wiersma T., Giovannoni S.J., Mur L.R., Pace N.R.* The relationship of a prochlorophyte *Prochlorothrix hollandica* to green chloroplasts // *Nature.* 1989. Vol. 337. P. 380- 382.
64. *Von Wintzingerode F., Gobel U.B., Stackebrandt E.* Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfall of PCR – based rRNA analysis// *FEMS Microbiol. Reviews.* 1997. Vol. 21. P. 213- 229.
65. *Wang G.C., Wang Y.* The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from different bacterial species // *Microbiology.* 1996. Vol. 142. P. 1107- 1114.
66. *Ward D.M., Weller R., Bateson M.M.* 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community // *Nature.* 1990. Vol. 345. P. 63-65.
67. *Ward E.S., Gussow D., Griffiths A.D. et al.* Binding activities of repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli* // *Nature,* 1989. Vol.341.P544-546.
68. *Wise M.G., McArthur J.V., Shimkets L.J.* Bacterial diversity of a Carolina bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. Vol. 63. P. 1505-1514.
69. *Woese C.R., Fox G.E.* Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms // *PNAS.* 1977. Vol. 74. P. 5088-5090.

### ***Вспомогательная литература***

70. *Арефьев В.А., Лисовенко Л.А.* Англо-русский толковый словарь генетических терминов. М.: ВНИРО. 1995. 407 с.
71. *Кларк Д., Рассел Л.* Молекулярная биология: простой и занимательный подход. М.: ЗАО «Компания КОНД». 2004. 472 с.
72. *Кольман Я., Рем К.-Г.* Наглядная биохимия. М.: Мир. 2004. 469 с.
73. *Кузнецова Н.Н., Винтер В.Г.* Методы генной инженерии: учебное пособие. Москва: Биоинформсервис. 1997, 180 с.
74. *Рис.Э., Стернберг М.* Введение в молекулярную биологию: От клеток к атомам. М.: Мир. 2002. 142 с.

Учебно-методическое пособие

**Белькова Н.Л., Андреева А.М.**

**ВВЕДЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНУЮ ЭКОЛОГИЮ  
МИКРООРГАНИЗМОВ**

Подписано в печать 22.07.2009. Формат 70x100/16.

Гарнитура “Times New Roman”.

Бумага офсетная. Тираж 50 экз. Заказ №1437.

Усл. печ. л. 7,51.

Отпечатано в ООО «Принтхаус»

150000, Россия, г. Ярославль, ул. Свободы, 12Б,

(4852) 73-04-74, 30-49-80

e-mail: [printhouse-yar@yandex.ru](mailto:printhouse-yar@yandex.ru), [print\\_house-06@inbox.ru](mailto:print_house-06@inbox.ru)

[www.printhouse.yar.ru](http://www.printhouse.yar.ru)