

КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Биолого-почвенный факультет

Соловьева В.В., Григорьева Т.В., Ризванов А.А.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ С ПОМОЩЬЮ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНОЙ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА 16S РИБОСОМНОЙ РНК

Методическое пособие



Казань
2011

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета ФГАОУВПО
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»*

*Учебно-методической комиссии биолого-почвенного факультета
Протокол №4 от 15 декабря 2010 г.*

Научный редактор
доктор биол. наук, проф. М.Р. Шарипова

Рецензент
доктор биол. наук, проф. Р.П. Наумова

Соловьева В.В.

Идентификация микроорганизмов с помощью молекулярно-генетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рибосомной РНК. Методическое пособие / В.В. Соловьева, Т.В. Григорьева, А.А. Ризванов. – Казань: Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2011. – 44 с.

В методическом пособии описан подробный алгоритм по идентификации прокариотических микроорганизмов с использованием современной молекулярно-биологической техники. Приведены основные принципы работы с клетками прокариот, их генетическим материалом, а также с программным обеспечением для обработки и интерпретации данных.

Предназначено для студентов и аспирантов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям «Биология», «Генетика» и «Микробиология».

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ-----	5
ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ-----	6
Компоненты реакционной смеси-----	6
Циклический температурный режим -----	7
Способ постановки ПЦР с использованием "горячего старта"-----	8
Контроль прохождения реакции амплификации-----	9
Приготовление суспензии бактериальной биомассы микробных изолятов для молекулярно-генетического анализа -----	10
Реакция ПЦР-амплификации-----	10
ЭЛЕКТРОФОРЭЗ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ-----	12
Методика приготовления агарозного геля -----	13
Выделение ДНК из агарозного геля -----	16
РЕАКЦИЯ ЛИГИРОВАНИЯ-----	17
Постановка реакции лигирования-----	19
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК <i>ESCHERICHIA COLI</i> -----	19
ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК <i>E.COLI</i> И ТРАНСФОРМАЦИЯ-----	20
Приготовление компетентных клеток <i>Escherichia coli</i> -----	20
Генетическая трансформация клеток <i>Escherichia coli</i> -----	21
Описание штамма <i>E.coli</i> XL1-Blue-----	21
ПЦР-СКРИНИНГ КОЛОНИЙ -----	22
Долговременное хранение бактериальных штаммов-----	23
ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК -----	24
РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ -----	27
Постановка реакции рестрикции -----	27
СЕКВЕНИРОВАНИЕ-----	29
Постановка реакция секвенирования -----	29
Очистка фрагментов ПЦР-амплификации-----	31
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОРГАНИЗМА НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА ПЕРВИЧНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ -----	32
Множественное выравнивание с помощью программы Blastn-----	34
СПИСОК РЕАГЕНТОВ -----	39
СПИСОК ПРИБОРОВ-----	41
ЛИТЕРАТУРА -----	43

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А — аденин	Т — тимин
АТФ — аденоzinтрифосфат	УФ — ультрафиолет
БД — база данных	Ц — цитозин
В — вольт	Cl — хлор
г — грамм	IPTG — 7-изопропил- β -D-тиогалактозид
Г — гуанин	Mg — магний
ддНТФ — дидезоксинуклеотидилтрифосфат	H ₂ O — вода
ддТ — дидезокситимидин	S — единица Сведберга
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота	X-GAL — 5-Бром-4-хлор-3-индолил- <i>b</i> -D-галактозид
дНТФ — дезоксинуклеотидилтрифосфат	
л — литр	
м — метр	
М — моль	
мин — минута	
мл — миллилитр	
млг — миллиграмм	
мкл — микролитр	
мкМ — микромоль	
мм — миллиметр	
мМ — миллимоль	
об/мин — обороты в минуту	
п.н. — пар нуклеотидов	
ПЦР — полимеразная цепная реакция	
рРНК — рибосомная РНК	
РНК — рибонуклеиновая кислота	
сек — секунда	
см — сантиметр	
т.п.н. — тысяч пар нуклеотидов	

ВВЕДЕНИЕ

Как правило, для идентификации микроорганизмов применяют традиционные методы микробиологии, основанные на морфологических и физиологических признаках.

Достоверная идентификация микроорганизмов стала возможной с развитием биоинформатики и появлением современных методов молекулярной биологии — полимеразной цепной реакции, клонирования выделенных генов в бактериальных векторах и методик определения первичных нуклеотидных последовательностей (секвенирование). Один из удобных маркеров для идентификации микроорганизмов — ген, кодирующий 16S рибосомную РНК, который есть в геноме всех известных бактерий и архей. Ген 16S рРНК содержит как консервативные участки (нуклеотидные последовательности с высокой степенью гомологии, практически одинаковые для всех прокариот), так и вариабельные участки (нуклеотидные последовательности, демонстрирующие низкую степень гомологии и различающиеся даже между представителями близкородственных видов). Консервативные участки служат для первого этапа полимеразной цепной реакции — присоединения универсальных праймеров к исследуемой ДНК-матрице, а вариабельные — для идентификации видов на основании различий в нуклеотидной последовательности амплифицируемого участка ДНК. Степень схожести видоспецифичных вариабельных участков гена 16S рРНК отражает эволюционное родство разных видов.

ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — метод амплификации *in vitro*, с помощью которого за короткое время можно выделить и размножить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходное в сотни тысяч раз (Mullis, Faloona, 1987). Суть метода — многократное копирование (амплификация) в пробирке определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ферментом ДНК-полимеразой, и происходит многократное увеличение количества специфических фрагментов ДНК (Болдырева, 2005).

Области применения ПЦР: высокоэффективное клонирование геномных последовательностей (Scharf et al., 1986), прямое секвенирование митохондриальной и геномной ДНК (Wong et al., 1987), анализ вариаций нуклеотидных последовательностей и выявление возбудителей заболеваний (Kwok et al., 1987).

Компоненты реакционной смеси

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо наличие в реакционной смеси ряда компонентов (Саики, 1990):

Два праймера — искусственно синтезированные олигонуклеотиды, размером от 15 до 30 п.н., комплементарные соответствующим участкам ДНК-мишени.

Требования к нуклеотидной последовательности праймера:

1. Отсутствие внутренней вторичной структуры;
2. Сбалансированный состав нуклеотидов Г/Ц, А/Т и равномерное распределение Г/Ц, А/Т по всей последовательности;
3. Отсутствие комплементарности между 3'-концами для предотвращения образования димеров праймеров.

Оптимальная концентрация праймеров — 0,1–0,5 мкМ. Более высокая концентрация праймеров может приводить к неспециальному отжигу праймера и накоплению неспецифических продуктов ПЦР-амплификации.

Термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза). Общее свойство ДНК-полимераз — способность вести матричный синтез нуклеиновых кислот в направлении 5'→3'. Большинство ДНК-полимераз обладают также 3'→5' экзонуклеазной (корректирующей) активностью, предназначено для удаления ошибочно присоединенных нуклеотидов. Обычно для проведения реакции достаточно 0,5–2,5 единиц термостабильной полимеразы из *Thermus aquaticus* (Taq-полимеразы). Иногда увеличение концентрации фермента приводит к уменьшению специфичности.

Смесь 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (дНТФ — дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ) — используются *Taq*-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК. Несбалансированная смесь дНТФ (концентрация всех дНТФ не одинакова) уменьшает точность работы ДНК-полимеразы. Высокие концентрации дНТФ уменьшают концентрацию свободных ионов Mg^{2+} , что сказывается на активности ДНК-полимеразы и снижению температуры отжига праймеров.

Буфер — смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальные условия для реакции: стабильное значение pH и ионную силу раствора.

Анализируемый образец — подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который содержит искомую ДНК, служащую мишенью для последующей ПЦР-амplификации.

Ионы Mg^{2+} — необходимы для работы *Taq*-полимеразы. Диапазон рабочих концентраций: 0,5–5,0 мМ (10 мМ — ингибирует ДНК-полимеразу на 40–50%). Увеличение концентрации Mg^{2+} оказывает очень сильное влияние на специфичность и эффективность полимеразной цепной реакции: увеличивается выход ПЦР-продуктов, но снижается специфичность гибридизации праймеров. Оптимальная концентрация Mg^{2+} зависит от нуклеотидной последовательности ДНК-матрицы и праймеров. Mg^{2+} образует комплексы с дНТФ — именно эти комплексы являются субстратом для *Taq*-полимеразы. С Mg^{2+} стехиометрически связываются дНТФ, PPi (свободный пирофосфат), ЭДТА, РО₄. Повышение концентрации Mg^{2+} вызывает повышение температуры плавления ДНК, что приводит к уменьшению точности гибридизации праймеров.

Циклический температурный режим

В процессе реакции ПЦР-амplификации в анализируемом образце с искомой ДНК происходит ряд событий, обеспечиваемых определенными температурными параметрами. Каждый цикл амplификации состоит из трех этапов (Рыбчин, 2002):

1. **Денатурация.** Реакционную смесь нагревают до 95 °C, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются (денатурируются, плавятся) с образованием двух одноцепочечных молекул.

2. **Отжиг (присоединение, гибридизация праймеров).** Праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Присоединение прямого и обратного праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах целевого специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя

температура отжига, значения которой обычно располагаются в интервале 50–65 °С. Время отжига — 20–60 секунд.

3. Элонгация (синтез ДНК). Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях. Праймеры служат затравками для инициации синтеза ДНК. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты. На этом этапе температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Таq-полимеразы 72 °С.

Время элонгации выбирают в зависимости от длины амплифицируемого фрагмента ДНК и скорости работы (эффективности) ДНК-полимеразы. Обычно расчёт времени элонгации проводят по формуле $T(\text{элонгация}) = 1 \text{ минута} \times N(\text{т.п.н. ДНК})$.

Температурный цикл амплификации многократно повторяется (25 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается. Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфических фрагментов ДНК. Однако на практике эффективность ПЦР-амплификации ниже теоретического максимума за счёт амплификации неспецифических фрагментов ДНК и истощении компонентов реакции (Mullis, Falloona, 1987).

Завершающая достройка. Обычно, после последнего цикла ПЦР-амплификации, реакционную смесь инкубируют дополнительно в течении 5–15 минут при 72 °С для достройки частично синтезированных продуктов ПЦР (Саики, 1990).

Способ постановки ПЦР с использованием "горячего старта"

Чтобы уменьшить риск образования неспецифических продуктов реакции ПЦР-амплификации, используют подход, получивший название "горячий старт" (от англ. "hot-start"). Суть его состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров (Щелкунов, 2004).

В зависимости от ГЦ-состава и размера, праймеры имеют определенную температуру плавления, при которой образование водородных связей нестабильно. Если температура системы превышает температуру плавления, праймер не в состоянии удерживаться на цепи ДНК и денатурирует. При соблюдении оптимальных условий, то есть температуры отжига, близкой к температуре плавления, праймер образует двухцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и, таким образом, обеспечивает специфичность реакции. Один из вариантов реализации "горячего старта" —

внесение пробирок в лунки термоцикlera во время этапа первичной денатурации (Саики, 1990).

В этом случае, даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации (Щелкунов, 2004).

Контроль прохождения реакции амплификации

Положительный контроль позволяет удостовериться, что все компоненты, входящие в состав реакционной смеси, обеспечивают нормальное прохождение реакции. Для этого используют препарат ДНК, содержащий сайты для отжига праймеров: например, ДНК искомого организма или клонированные специфические участки его генома.

Контаминация — попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических и неспецифических молекул ДНК, способных служить мишениями в реакции амплификации и давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

Для уверенности в отсутствии контаминации необходимо каждую серию экспериментов сопровождать **отрицательными контролями**. В качестве отрицательных контролей рекомендуется использовать бидистиллированную воду (или Milli Q H₂O) вместо анализируемого образца.

Для разрушения чужеродной ДНК в реакционной смеси пробирку с реакционной смесью (без ДНК матрицы) подвергают воздействию ультрафиолетовой радиации в течение 10 минут.

Источниками заноса в реакционную смесь посторонней матрицы могут выступать:

- Лабораторное оборудование и пипетки, на которых могут оставаться следы случайной ДНК, оставшиеся после её выделения этим оборудованием;
- Перекрестная контаминация между образцами;
- Продукты предыдущей ПЦР.

Чтобы исключить контаминацию и уменьшить число ложноположительных результатов следуйте следующим правилам, принятым в лабораториях, где проводят ПЦР:

Оборудование лаборатории

- Разделите рабочие места, где Вы готовите матрицу для ПЦР, непосредственно проводите ПЦР и делаете анализ продуктов ПЦР.

- Смешивайте смеси для ПЦР в ламинарном шкафу или изолированном боксе, оборудованным УФ лампой. Там же держите микроцентрифугу, перчатки и другое необходимое для ПЦР оборудование, которое будет использовано только для ПЦР.

- Используйте специальные наконечники для пипеток с пористым фильтром и набор пипеток, который будет использоваться только для ПЦР.

Подготовка постановки ПЦР

- Используйте стерильные материалы и только новые перчатки, когда Вы готовите постановку ПЦР.

- Для подготовки ПЦР и матрицы для ПЦР используйте новые, ни разу неиспользованные, материалы (пластик, наконечники). Никогда не пользуйтесь мытыми и бывшими в употреблении материалами.

- Если реактивами для постановки ПЦР пользуются несколько человек, разделите исходные реактивы по аликовотам для каждого пользователя.

Приготовление суспензии бактериальной биомассы микробных изолятов для молекулярно-генетического анализа

В пробирку со скошенной питательной средой с бактериальной культурой добавьте 500 мкл бидистиллированной воды, ресуспензируйте колонии покачиванием пробирки и суспензию бактерий отберите в новую 1,5 мл центрифужную пробирку.

Реакция ПЦР-амплификации

Амплификация фрагмента гена 16S рРНК проводится с использованием универсальных прокариотических праймеров (Weisburg et al., 1991) по стандартной методике (Sambrook, 2001).

1. Перед началом работы разморозьте все компоненты реакции, кроме ДНК-полимеразы, (Таблица 1) и поместите их на лед для временного хранения.

2. 0,2 мл пробирку поместите на лед, добавьте 35,8 мкл бидистиллированной воды, 5 мкл 10X *Taq*-буфера, 4 мкл 2 mM MgCl₂, 1 мкл 0,2 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов, по 1 мкл прямого и обратного праймеров, 2 мкл матрицы ДНК, 0,2 мкл *Taq*-полимеразы, конечный объем составит 50 мкл.

3. Реакционную смесь в 0,2 мл пробирке перемешайте на вортексе *Multi-Vortex V-32*, и осадите капли на микроцентрифуге *Heraeus Pico 17 centrifuge* 15 секунд при максимальных оборотах (13,3 тыс. об/мин).

Таблица 1. Состав реакционной смеси для ПЦР

Компоненты реакции	Объем, мкл
10X <i>Taq</i> -буфер	5
2 мМ MgCl ₂	4
0,2 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты	1
20 мкМ праймер прямой*	1
20 мкМ праймер обратный*	1
Матрица ДНК	2
<i>Taq</i> -полимераза 5 ед/мкл	0,2
Бидистиллированная H ₂ O	35,8
Конечный объем реакции	50

*название и последовательности праймеров показаны в таблице 2. Праймеры синтезировала компания Синтол (Россия).

4. Установите программу термоцикlerа (Таблица 3).

5. Поместите пробирку с реакционной смесью в лунку термоцикlerа *MJ Mini Personal Thermal Cycler*, плотно закройте крышку термоцикlerа.

Таблица 2. Специфичные праймеры для амплификации фрагмента гена 16S pРНК

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
Универсальный прокариотический прямой праймер 16S-8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Универсальный прокариотический обратный праймер 16S-1492R	GGTTACCTGTTACGACTT

Таблица 3. Режим ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S рРНК

Температура	Время	Описание этапа	
95 °C	2 мин	предварительный нагрев	
94 °C	30 сек	денатурация	
55 °C	30 сек	отжиг	
72 °C	2 мин	синтез	
72 °C	7 мин	окончательный синтез	
10 °C		хранение	

35 циклов

5. После окончания ПЦР-амплификации, образцы можно проанализировать методом электрофореза в агарозном геле. Хранить амплифицированный образец необходимо при -20 °C.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Электрофорез ДНК — аналитический метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. Электрофорез ДНК проводится в горизонтальном направлении (Остерман, 1996).

Сахарофосфатный остав молекул ДНК заряжен отрицательно, поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду под действием сил электрического поля. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее (Маниатис, 1984).

Для визуализации результата в расплавленную агарозу вносят флуоресцентный краситель бромистый этидий, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в УФ-лучах (Dretzen, 1991).

Для анализа размеров полученных ДНК-фрагментов используют ДНК-маркеры — линейные фрагменты ДНК известной длины.

Большое значение имеет напряжение электрического поля, с увеличением которого понижается эффективность разделения. Для достижения максимальной эффективности разделения фрагментов ДНК напряженность не должна превышать 5 вольт на сантиметр геля (Girvitz, 1990).

В состав геля входят: 1X ТАЕ (рН 8,1), агароза, бромистый этидий. В зависимости от процентности геля добавляется разное количество его компонентов. Процентность геля выбирается в зависимости от длины

разгоняемых в нем фрагментов ДНК. Для анализа фрагментов гена 16S рРНК (длина около 1500 п.н.) оптимально подходит 1% агарозный гель.

Методика приготовления агарозного геля

1. До заливки геля в ванне для электрофореза установите гребенки из оргстекла для создания лунок для нанесения образцов. Гребенки установите так, чтобы нижняя часть зубцов гребенки располагалась в 2 мм от основания геля общим объемом 50 мл (для геля, объемом 150 мл расстояние от основания геля до нижней части зубцов гребенки — 1 мм).

2. Для приготовления 50 мл 1% агарозного геля добавьте 50 мл 1X ТАЕ и 0,5 г агарозы. 1X ТАЕ готовится из раствора ТАЕ с исходной концентрацией 50Х (Трис, 0,5 М ЭДТА pH 8,0, ледяная уксусная кислота).

3. Навеску агарозы растворите в 1X ТАЕ с помощью нагревания до кипения таким образом, чтобы раствор стал гомогенным, то есть не содержал нерастворенных частиц агарозы.

4. После этого раствор охладите примерно до 50 °C, добавьте 0,5 мкл бромистого этидия.

5. Залейте весь объем геля в ванну для электрофореза. После того, как гель застыл (30–45 минут при комнатной температуре), осторожно удалите гребенки и залейте ванну для электрофореза буфером 1X ТАЕ до тех пор, пока гель не окажется погруженным в раствор полностью.

6. Смешайте пробы с буфером для нанесения 6X Loading Dye (состоит из: 0,4% оранжевого G, 0,03% бромфенолового синего, 0,03% ксилен-цианола FF, 15% Фиколла 400, 10 мМ трис-HCl pH 7,5 и 50 мМ ЭДТА pH 8,0) так, чтобы его итоговая концентрация в пробе для нанесения была 1X и микропипеткой внесите их в лунки агарозного геля под электрофорезный буфер.

7. Для анализа размеров полученных ДНК-фрагментов в одну из лунок добавьте 2,5 мкл ДНК-маркера *DirectLoad™ Wide Range DNA Marker*.

8. Разделение ДНК проводите при напряжении 80В.

9. После окончания электрофореза гель просмотрите в УФ-свете на трансиллюминаторе *UV Transilluminator TFP-M\WL* и сфотографируйте системой регистрации результатов электрофореза *Gel Imager GI-2*.

В качестве примера на рисунке 1 показан анализ продуктов ПЦР, который показал амплификацию ДНК фрагмента гена 16S рРНК во всех 5 образцах. Длина амплифицированной нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК составляет приблизительно 1500 п.н.

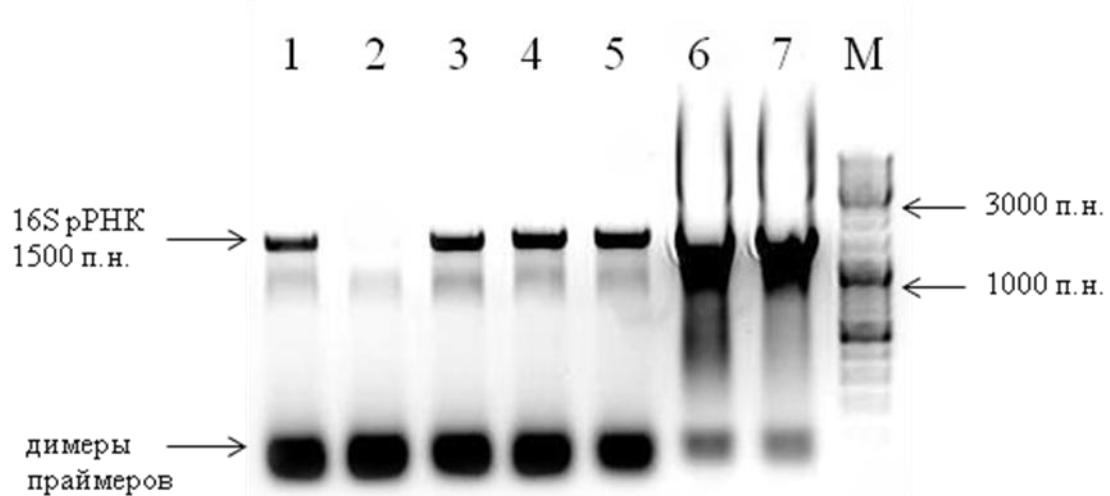


Рис. 1. Анализ ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S pРНК при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. 1 — положительный контроль (фрагмент гена 16S pРНК, встроенный в плазмиду pGEM[®]-T Easy), 2 — отрицательный контроль, 3–7 — образцы ДНК изолятов почвенных микроорганизмов, М — ДНК-маркер GeneRulerTM DNA Ladder Mix (Sigma, США)

10. Необходимый ПЦР-фрагмент вырежьте из геля скальпелем, поместите в 1,5 мл центрифужную пробирку и взвесьте на весах. ПЦР-фрагменты можно выделить из геля с помощью различных наборов по методике, рекомендуемой производителем.

В таблице 4 указаны возможные проблемы при анализе продуктов ПЦР-амплификации и способы их решения.

Таблица 4. Возможные проблемы и способы их решения

Проблема	Возможная причина	Возможные способы решения
ДНК в геле выглядит как размазанная полоска (шмер)	Деградирует продукт	Найдите источник загрязнения нуклеазами; убедитесь, что материал не хранился долго и повторите ПЦР
	Неспецифическая амплификация	Подберите более специфические праймеры или более оптимальные условия реакции
	Избыток матрицы ДНК	Возьмите меньшие количества матрицы ДНК
Неспецифические полосы по дорожке на геле	Неспецифическая амплификация	Подберите более специфические праймеры или более оптимальные условия реакции
	Избыток матрицы ДНК	Возьмите меньшие количества матрицы ДНК
Полоса продукта ПЦР-амплификации слабая или отсутствует	Слабо прокрашен гель	Добавьте в агарозу больше бромистого этидия
	Отсутствует матрица ДНК в пробе	Добавьте матрицу ДНК
	Деградировали праймеры	Синтезируйте новые праймеры
	Праймеры не отжигаются на матрице ДНК	Подберите более специфические праймеры
	Неправильные условия проведения ПЦР	Подберите более оптимальные условия ПЦР
	Вышел из строя амплификатор	Проведите ПЦР на другом амплификаторе

Выделение ДНК из агарозного геля

Способ 1. Выделение ДНК из агарозного геля с использованием сорбента Набором DNA Extraction Kit #KOS13

1. Добавьте Binding Solution (связывающий буфер) в 1,5 мл центрифужную пробирку с вырезанным из геля фрагментом агарозы в пропорции 3 объема буфера к 1 массе вырезанного из геля участка.

2. Инкубируйте смесь в 1,5 мл пробирке в термоблоке при 55 °C в течение 15 минут, чтобы расплавить гель.

3. В пробу с расплавленным гелем добавьте 5 мкл Silica powder suspension (сuspензия кремневого сорбента). Смесь в 1,5 мл пробирке перемешайте на вортексе. Суспензию кремневого сорбента необходимо предварительно перемешать на вортексе до гомогенного состояния.

4. Инкубируйте смесь в 1,5 мл пробирке в термоблоке при 55 °C в течение 5 минут. Через каждые 2 минуты раствор нужно перемешивать на вортексе.

5. Центрифугируйте смесь в 1,5 мл пробирке в течение 5 секунд при максимальных оборотах (13,3 тыс. об/мин) на микроцентрифуге *Heraeus Pico 17 centrifuge*. После центрифугирования из пробирки микропипеткой аккуратно удалить супернатант (верхняя водная фаза).

6. К осадку добавьте 500 мкл Wash Buffer (буфер для промывки, хранится при -24 °C) и ресуспензируйте смесь на вортексе до растворения осадка.

7. Центрифугируйте смесь в 1,5 мл пробирке в течение 5 секунд при максимальных оборотах, удалите супернатант.

8. Повторить пункты 6 и 7 еще два раза.

9. Полностью удалите супернатант, высушите пробирки с осадком в термоблоке при 55 °C в течение нескольких минут.

10. Добавьте к осадку 25 мкл Elution Buffer (буфер для элюции), ресуспензируйте смесь на вортексе, и инкубируйте в термоблоке в течение 5 минут при 55 °C. Центрифугируйте смесь в 1,5 мл пробирке при максимальных оборотах в течение 30 секунд.

11. Супернатант перенесите в новую 1,5 мл центрифужную пробирку.

12. Повторить пункты 10 и 11 еще один раз.

13. В 1,5 мл пробирке теперь находится элюированная ДНК.

14. Очищенные набором ПЦР-фрагменты хранить при температуре от +2 °C до +4 °C или от -15 °C до -25 °C.

Способ 2. Выделение ДНК из арарозного геля с использованием колонок Набором EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit

1. Добавьте в 1,5 мл пробирку с вырезанным из геля участком Binding Buffer II (связывающий буфер; хранится при +4 °C) в пропорции: 3 объема буфера к 1 массе вырезанного из геля участка.

2. Инкубируйте смесь в 1,5 мл пробирке в течение 10 минут при 55 °C в термоблоке до растворения геля.

3. Перелейте содержимое пробирки в колонку с сорбентом, вставьте колонку в чистую 2 мл центрифужную пробирку. Инкубируйте смесь в колонке в течение 2 минут при комнатной температуре.

4. Центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 1 минуты при 5 тыс. об/мин. Удалите из 2 мл пробирки центрифугат (осажденную жидкость).

5. Добавьте в колонку 500 мкл Wash Solution (буфер для промывки).

6. Центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 1 минуты при 8 тыс. об/мин. Удалите из 2 мл пробирки центрифугат.

7. Повторите пункты 5 и 6 еще один раз.

8. Центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 30 секунд при 10 тыс. об/мин.

9. Перенесите колонку в новую 1,5 мл центрифужную пробирку.

10. Добавьте в колонку 20 мкл Elution Buffer (буфер для элюции) в центр мембранны, инкубируйте в течение 2 минут при комнатной температуре.

11. Центрифугируйте колонку в 1,5 мл пробирке в течение 1 минуты при 10 тыс. об/мин.

12. Повторите пункты 10 и 11 еще один раз.

13. В 1,5 мл пробирке остается элюированная ДНК.

15. Очищенные набором ПЦР-фрагменты хранить при температуре от +2 °C до +4 °C или от -15 °C до -25 °C.

РЕАКЦИЯ ЛИГИРОВАНИЯ

Для реакции лигирования (ковалентное соединение двух молекул ДНК) необходимы следующие компоненты: фермент ДНК-лигаза T4, буфер 10X T4 ДНК-Лигазы, плазмида (вектор) PTZ57R/T и выделенный из геля ПЦР-фрагмент ДНК.

Фермент ДНК-лигаза T4 — мономерный полипептид молекулярной массой 55,3 кДа. Фермент катализирует образование фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатной и 3'-гидроксильными концевыми группами ДНК. Помимо лигирования липких концов, она способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами.

Выделена из штамма *Escherichia coli*, несущего рекомбинантный клонированный ген ДНК-лигазы из фага T4. Оптимальная температура действия +16 °С. Температура хранения -20 °С.

Буфер 10Х ДНК-Лигазы обеспечивает оптимальные условия для реакции лигирования. В его состав входят: 400 мМ трис-HCl pH 7,8, 100 мМ MgCl₂, 100 мМ DTT (дитиотреитол), 5 мМ АТФ. Буфер следует хранить (при -20 °С) небольшими аликовтами, не размораживая многократно, для избежания разложения АТФ.

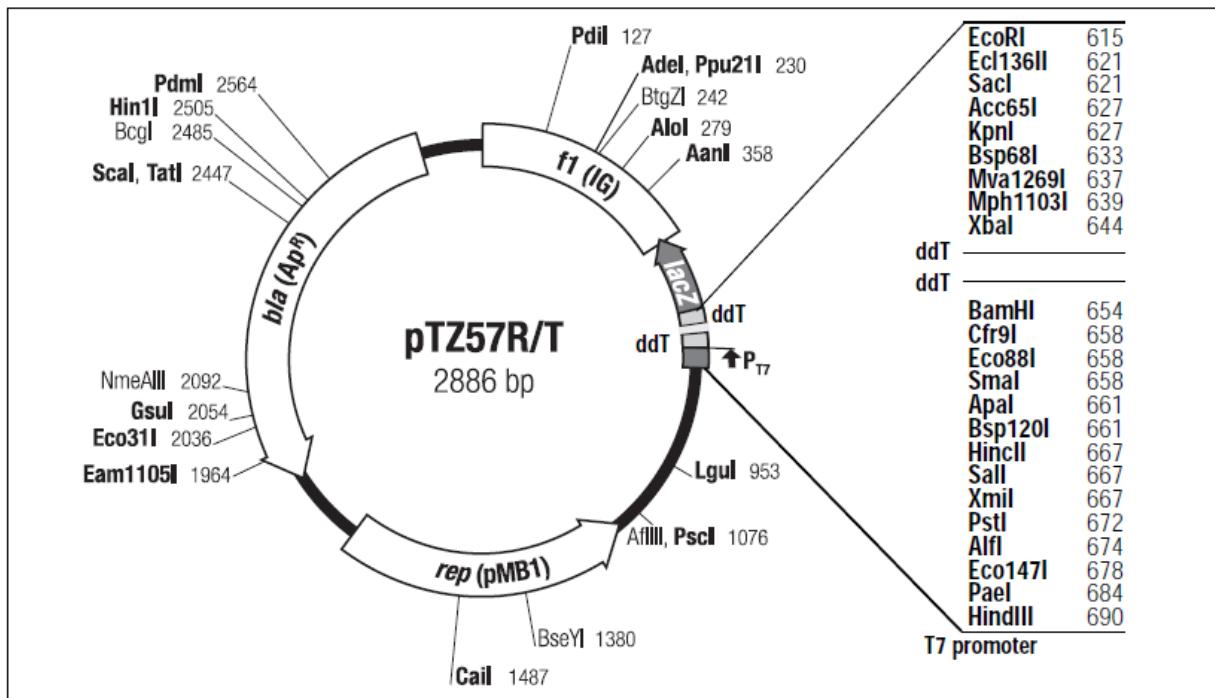


Рис. 2. Карта вектора PTZ57R/T (www.helicon.ru)

Плазмида (вектор) PTZ57R/T (Рис. 2) используется для Т/А клонирования ПЦР-фрагмента и последующей трансформации в бактериальные клетки *E. coli*. Достоинства вектора pTZ57R/T:

- Представляет собой линейную молекулу двунитевой ДНК;
- Содержит дидезокситимидин (ddT) на 3'-конце обеих цепей, что предотвращает рециклизацию вектора в процессе лигирования и обеспечивает высокий выход продуктов клонирования и низкий уровень побочных продуктов;
- Позволяет использовать сине-белый тест для оценки эффективности клонирования;
- Содержит участки узнавания многих эндонуклеаз рестрикции, что дает возможность проводить дальнейшие манипуляции с клонированным фрагментом;

- Имеет в своем составе нуклеотидную последовательность, комплементарную праймеру M13/pUC, что позволяет выполнять секвенирование ДНК-фрагмента или ПЦР-анализ;
- Имеет T7 промотор, который дает возможность транскрибировать вставленный ДНК-фрагмент *in vitro*.

Постановка реакции лигирования

1. Перед началом работы разморозьте все компоненты реакции (Таблица 4), кроме ДНК-лигазы T4 и поместите их на лед для временного хранения при 4 °C.

2. 1,5 мл пробирку поместите на лед, добавьте 3,7 мкл очищенного из агарозного геля ПЦР-фрагмента, 0,5 мкл 10Х T4 буфера ДНК-лигазы, 0,5 мкл плазмида PTZ57R/T и 0,3 мкл T4 ДНК-лигазы, конечный объем составит 5 мкл.

3. Реакционную смесь в 1,5 мл пробирке инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре.

Таблица 4. Состав реакционной смеси для реакции лигирования

Компоненты реакции	Объем, мкл
Плазмида (вектор) PTZ57R/T	0,5
Буфер ДНК-лигаза T4 10Х	0,5
ПЦР-фрагмент ДНК	3,7
ДНК-лигаза T4	0,3
Конечный объем реакции	5

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*

Для культивирования клеток *E. coli* штамм XL1-Blue можно использовать 2 вида питательных сред: LB (среда мало солевая Лурия-Бертани) и LB агаризованные (Таблицы 5 и 6).

Таблица 5. Состав среды LB (pH 7,5)

Название компонента	Количество
Триптон	10 г/л
Дрожжевой экстракт, без содержания солей, тип Д	5 г/л
Натрий хлорид NaCl 5M	10 г/л
Деионизированная вода	1 л

Таблица 6. Состав агаризованной среды LB

Название компонента	Количество
Триптон	10 г/л
Дрожжевой экстракт, без содержания солей, тип Д	5 г/л
Натрий хлорид NaCl 5М	10 г/л
Агар	5 г/л
Деионизированная вода	1 л

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* И ТРАНСФОРМАЦИЯ

Трансформация — изменение наследственных свойств клеток в результате проникновения в них чужеродной ДНК. Состояние клеток, при котором они способны к поглощению ДНК, называют состоянием компетентности. Обычно максимальное число компетентных клеток наблюдается в конце фазы логарифмического роста (экспоненциальная фаза). Эта фаза характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток, величина клеток и содержание в них белка у многих бактерий тоже остаются постоянными.

В состоянии компетентности бактерии вырабатывают особый низкомолекулярный белок (фактор компетентности), активизирующий синтез аутолизина, эндонуклеазы I и ДНК-связывающего белка. Аутолизин частично разрушает клеточную стенку, что позволяет ДНК пройти через неё, а также снижает устойчивость бактерий к осмотическому шоку (Грант, 1980). В состоянии компетентности также снижается общая интенсивность метаболизма. ДНК для бактериальной трансформации должна быть двухнитевой, её длина — не менее 450 пар нуклеотидов. Оптимальное рН для прохождения процесса — около 7.

Приготовление компетентных клеток *Escherichia coli* с использованием CaCl_2 метода (Cohen et al., 1972)

1. Для приготовления компетентных клеток выберете одну бактериальную колонию *E. coli* штамм XL1-Blue, диаметром 2–3 мм, из выращиваемых на чашках Петри в течение 16–20 часов при 37 °C и внесите ее в колбу со средой LB.

2. Инкубируйте в термостате 3 часа при 37 °C, после чего из этой колбы перенесите по 25 мл культуры в 2 стерильных охлажденных полипропиленовых тубуса и инкубируйте на льду 10 минут.

3. Далее культуру в тубусах центрифугируйте в течение 10 минут при 4 °C, 6 тыс. об/мин, затем надосадочную жидкость аккуратно слейте в стакан для отходов и, не переворачивая обратно, поставьте тубус дном наверх на фильтровальную бумагу для удаления остатков надосадочной жидкости.

4. Осадок в каждом тубусе ресуспензируйте в 15 мл заранее приготовленного и охлажденного раствора, содержащего 10 mM MgCl₂ и 5 mM CaCl₂.

5. Полученную смесь центрифугируйте 10 минут при 4 °C, 6 тыс. об/мин, по окончании центрифугирования удалите надосадочную жидкость, осадок в каждом тубусе ресуспензируйте в 2 мл заранее приготовленного и охлажденного раствора 0,1 M CaCl₂.

Генетическая трансформация клеток *Escherichia coli*

1. В каждую предварительно охлажденную в течение 5 минут 1,5 мл центрифужную пробирку добавьте по 200 мкл раствора компетентных клеток из тубусов, а также по 2 мкл лигационной смеси, полученной на предыдущем этапе.

2. Раствор компетентных клеток, смешанных с продуктами реакции лигирования, выдержите на льду 30 минут, после чего проведите тепловой шок на водяной бане TW-2.03 при 42 °C в течение 90 секунд, по прошествии которых пробирки с трансформированными клетками незамедлительно перенесите обратно на лед.

3. Затем добавьте 800 мкл среды LB и инкубируйте в шейкере 1 час при 37 °C.

4. После инкубации бактерии высейте на селективную среду, содержащую ампициллин (в концентрации 100 мг/мл), тетрациклин (в концентрации 12,5 мг/мл), 40 мкл 100 mM IPTG и 40 мкл 1 mM X-GAL.

5. Чашки инкубируйте в термостате в течение 14–16 часов при 37 °C.

Описание штамма *E.coli* XL1-Blue

Генотип: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F', proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(Tet^R)]. Чашка: среда LB агаризованная с добавлением тетрациклина (концентрация 12,5 мг/мл). Жидкая культура: LB.

Штамм позволяет проводить сине-белый тест. Частично инактивирована система рестрикции. Выращивание плазмид и фагемид. F' эписома маркирована геном устойчивости к тетрациклину. Однако не стоит добавлять тетрациклин в жидкую культуру для выделения плазмиды — он вызывает проблемы с клеточной стенкой бактерий и они слипаются при осаждении центрифугированием.

ПЦР-СКРИНИНГ КОЛОНИЙ

Выросшие белые колонии необходимо проверить на наличие вставки плазмида с интересующим нас геном. Для этого проводится ПЦР-скрининг колоний. В таблице 7 приводится список использованных для ПЦР-скрининга реагентов. Методика постановки реакции такая же, как и при ПЦР-амплификации, только вместо ДНК образца добавляется бактериальная колония (Sambrook, 2001):

1. Часть колонии перенести в пробирку, содержащую ПЦР реакционную смесь (Таблица 7), с помощью стерильной зубочистки или носика для микропипетки.
2. Далее носик (или зубочистку) опустите в пробирку с реакционной смесью, и сделайте пересев колонии на новую чашку с ампициллином и тетрациклином.
3. Чашку инкубируйте 14–16 часов в термостате при 37 °C.
4. Режим ПЦР-амплификации см. в таблице 8.

Таблица 7. Состав реакционной смеси для ПЦР-скрининга

Компоненты реакции	Объем, мкл
10X <i>Taq</i> -буфер	2
2 мМ MgCl ₂	0,8
0,2 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты	0,2
20 мкМ праймер прямой*	0,2
20 мкМ праймер обратный*	0,2
<i>Taq</i> -полимераза 5 ед/мкл	0,05
Бидистиллированная H ₂ O	6,55
Конечный объем реакции	10

*название и последовательности праймеров показаны в таблице 8. Праймеры синтезировала компания Синтол (Россия).

Амплификацию вставочного фрагмента в плазмиде PTZ57R/T (содержащего фрагмент гена 16S рРНК) проводите с использованием вектор-специфичных праймеров.

Таблица 8. Праймеры, используемые для ПЦР-амплификации вставочного фрагмента в плазмиде pTZ57R|T

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
pUC/M13 Forward	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC
pUC/M13 Reverse	TCACACAGGAAACAGCTATGAC

После окончания ПЦР-амплификации, образцы проанализируйте методом электрофореза в 1% агарозном геле.

В качестве примера на рисунке 3 показан ПЦР-скрининг колоний одного образца.

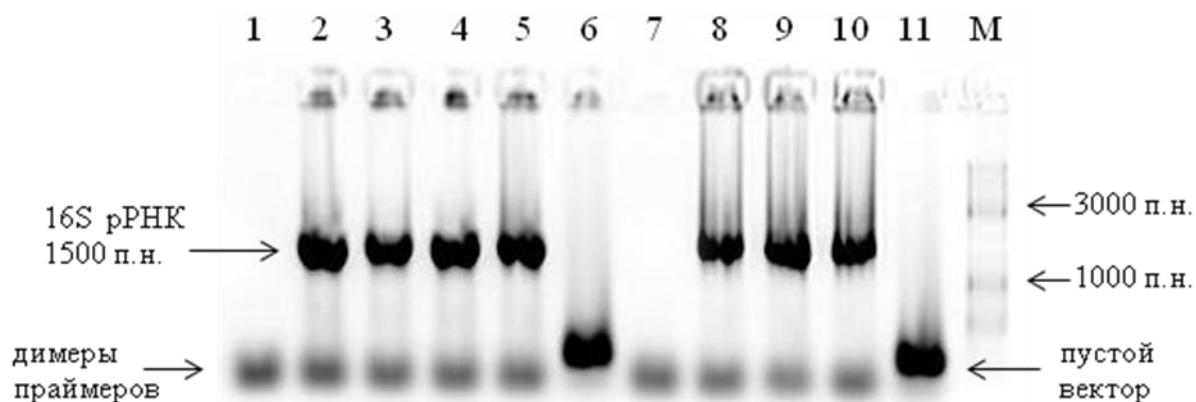


Рис. 3. Анализ результатов ПЦР-скрининга колоний *E. coli* при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. 1 — отрицательный контроль, 2 — положительный контроль (фрагмент гена 16S рРНК, встроенный в плазмиду pTZ57R|T), 3–10 — анализируемые колонии, где 3–5, 8–10 — позитивные колонии со вставкой, 6,11 — продукт ПЦР-амплификации вектора без вставки (пустой вектор), М — ДНК-маркер GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Sigma, США)

Дальнейшая работа проводится с ПЦР позитивными колониями, содержащими рекомбинантные плазмиды с интересующей нас вставкой.

Бактерии инокулируйте в 15 мл пробирку, содержащую 5 мл среды с ампициллином (в концентрации 100 мг/мл) и инкубируйте в термостате в течение 14–16 часов при 37 °C с интенсивным перемешиванием.

Долговременное хранение бактериальных штаммов

Клетки *E. coli* не рекомендуют хранить больше двух недель при температуре +4 °C. Частый пересев колоний не рекомендован так как он приводит к генетической нестабильности рекомбинантных плазмид и повышает вероятность спонтанных мутаций. Для долговременного хранения при низких температурах (от -12 °C до -80 °C) к клеткам добавляют

криопротектор (глицерол), который не дает возможности образовываться внутри клетки кристаллам льда.

Приготовление бактериальной культуры *Escherichia coli* для долговременного хранения

Для криоконсервации образца (приготовления «стока») в чистой пробирке (объем 1,5 мл) к 0,5 мл бактериальной культуры добавьте 0,5 мл стерильного 80% глицерола. Перемешайте на вортексе. Заморозьте и храните при -80 °C.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

После инкубации из бактериальных клеток нужно выделить плазмидную ДНК.

Плазмидную ДНК из бактериальных клеток можно выделить с помощью различных наборов по методике, рекомендуемой производителем.

Способ 1. Выделение плазмидной ДНК набором Fermentas Gene JETTM Plasmid Miniprep Kit # K0502

1. 1,5 мл бактериальной культуры перенесите в 1,5 мл центрифужную пробирку, центрифугируйте при максимальных оборотах (13,3 тыс. об/мин) в течение 30 секунд, супернатант удалите с помощью микропипетки.

2. К осадку добавьте 250 мкл Buffer P1 (хранится при -4 °C), перемешайте на вортексе до растворения осадка.

3. Добавьте 250 мкл лизирующего буфера Buffer P2 (содержит ионный детергент SDS и NaOH; при его добавлении происходит разрушение клеточной мембраны), 6 раз переверните 1,5 мл пробирку. Не перемешивать на вортексе!

4. Добавить 350 мкл нейтрализующего буфера Buffer N3 (содержит ацетат натрия или калия), 6 раз переверните 1,5 мл пробирку.

5. Центрифугируйте в течение 5 минут при максимальных оборотах.

6. Аккуратно перенесите супернатант в колонку с сорбентом. Колонку поставьте в 2 мл центрифужную пробирку.

7. Центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 1 минуты при максимальных оборотах. Удалите центрифугат из 2 мл пробирки.

8. В колонку добавьте 500 мкл буфера для промывки Buffer PB (содержит C₂H₅OH).

9. Центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 1 минуты при максимальных оборотах. Удалите центрифугат из 2 мл пробирки.

10. В колонку добавьте 750 мкл буфера для промывки Buffer PE.

11. Центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 1 минуты при максимальных оборотах. Удалите центрифугат из 2 мл пробирки.

12. Снова центрифугируйте колонку в 2 мл пробирке в течение 1 минуту при максимальных оборотах для полного удаления буфера для промывки.

13. Перенести колонку в новую 1,5 мл центрифужную пробирку, добавьте в колонку 50 мкл буфера для элюции Elution Buffer. Инкубируйте в течение 1 минуты при комнатной температуре.

14. Центрифугируйте колонку в 1,5 мл пробирке в течение 1 минуты при максимальных оборотах. В 1,5 мл пробирке остается плазмидная ДНК, колонку выкинуть.

15. Выделенную набором плазмидную ДНК хранить при температуре от +2 °C до +4 °C или от -15 °C до -25 °C.

Способ 2. Выделение плазмидной ДНК Набором Roche High Pure Plasmid Isolation Kit

1. Положите связывающий буфер Binding Buffer в холодильник до начала выделения.

2. Приготовьте начальные материалы:

- Осадите на центрифуге бактериальные клетки из 0,5–4,0 мл культуры *E. coli* (концентрация клеток должна быть 1,5–5,0 A₆₀₀ ед/мл).

- Уберите супернатант.

- Добавьте 250 мкл Suspension Buffer, содержащий РНКазу (хранится при -4°C) в 1,5 мл пробирку с осажденными бактериальными клетками.

- Ресуспензируйте на вортексе.

3. Последующая обработка бактериальных клеток:

- Добавьте 250 мкл лизирующий буфер Lysis Buffer.

- Переверните 1,5 мл пробирку 3–6 раз (перемешивать на вортексе и сильно взбалтывать нельзя, так как может разрушится геномная ДНК).

- Инкубируйте в течении 5 минут при 15–25 °C (не инкубировать более 5 минут).

4. Последующая обработка лизата:

- Добавьте 350 мкл охлажденного связывающего буфера Binding Buffer.

- Переверните 1,5 мл пробирку 3–6 раз.

- Инкубируйте в охлажденной подставке в течение 5 минут (раствор должен стать мутным).

- Центрифугируйте смесь в 1,5 мл пробирке в течение 10 минут при максимальных оборотах (13,3 тыс. об/мин).

5. После центрифугирования:

- Вставьте колонку High Pure Filter Tube в центрифужную пробирку Collection Tube.

- Перенесите весь супернатант из пункта 4 в колонку Filter Tube.
- Центрифугировуйте колонку в течение 1 минуту при максимальных оборотах.

6. После центрифугирования:

- Удалите колонку Filter Tube из пробирки Collection Tube, вылейте жидкость и вставьте колонку Filter Tube в ту же самую пробирку Collection Tube.

- Если штамм *E. coli* в пункте 2 – с высоким содержанием нуклеаз (например, HB101 или JM штаммы), выполните дополнительный промывающий шаг до выполнения пункта 7.

- Если штамм *E. coli* в пункте 2 – с низким содержанием нуклеаз (например, XL1Blue или DH5 штаммы), пропустите промывающий шаг и выполните пункт 7.

Необязательный промывающий шаг (для устранения высокой нуклеазной активности):

- Добавьте 500 мкл буфера для промывки Wash Buffer 1 в колонку Filter Tube.

- Центрифугируйте 1 минуту при максимальных оборотах и слейте центрифугат.

7. Промывка клеток:

- Добавьте 700 мкл буфера для промывки Wash Buffer 2 в колонку Filter Tube.

- Центрифугируйте 30–60 секунд при максимальных оборотах и слейте центрифугат.

- Еще раз центрифугируйте колонку при максимальных оборотах 1 минуту (повторное центрифугирование обеспечивает удаление остатков буфера для промывки Wash Buffer).

- Выкиньте пробирку Collection Tube.

8. Элюция ДНК:

- Вставьте колонку Filter Tube в чистую 1,5 мл центрифужную пробирку.

- Добавьте 100 мкл буфера для элюции Elution Buffer или 200 мкл бидистиллированной воды (рН от 8,0 до 8,5) в колонку Filter Tube.

- Центрифугируйте в течение 1 минуты при максимальных оборотах.

9. В пробирке сейчас содержится плазмидная ДНК. Далее ее можно использовать для клонирования или секвенирования. Хранить при температуре от +2 °C до +4 °C или от -15 °C до -25 °C.

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

Рестрикты — это эндонуклеазы, узнающие определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК и гидролизующие ДНК внутри сайтов или вблизи них. Известно не менее 1 тысячи рестрикта. Выделяют 3 типа рестрикта:

- **I тип** и **III тип** — молекула белка, несущая на своей цепи две активности, рестриктурующую и модифицирующую. Для рестрикции необходима энергия АТФ.
- **II тип** — 2 белка: рестрикта и модифицирующий фермент. АТФ для рестрикции не требуется.

Постановка реакции рестрикции

Перед началом работы разморозьте все компоненты реакции (Таблица 9), кроме рестрикта (Таблица 10) и поместите их на лед для временного хранения при 4 °C.

1,5 мл пробирку поместите на лед, добавьте 8 мкл плазмидной ДНК (плазмида pTZ57R/T с вставкой гена 16S rРНК), 0,5 мкл фермента EcoRI, 0,5 мкл фермента BamHI и 1 мкл буфера 10x React Buffer 0. Конечный объем реакционной смеси — 10 мкл.

После добавления всех компонентов реакционную смесь в 1,5 мл пробирке инкубируйте в термостате в течение 1 часа при 37 °C.

Пробы ДНК после рестрикционного анализа нанесите на 0,8% агарозный гель, добавив специальный буфер для нанесения — 6X Loading Dye так, чтобы его итоговая концентрация в пробе для нанесения была 1X.

В качестве примера на рисунке 4 показан анализ результатов рестрикционного расщепления плазмидной ДНК при помощи электрофореза в 0,8% агарозном геле.

Таблица 9. Состав реакционной смеси для реакции лигирования

Компоненты реакции	Объем, мкл
EcoRI	0,5
BamHI	0,5
10x React Buffer O	1
Плазмидная ДНК	8
Конечный объем реакции	10

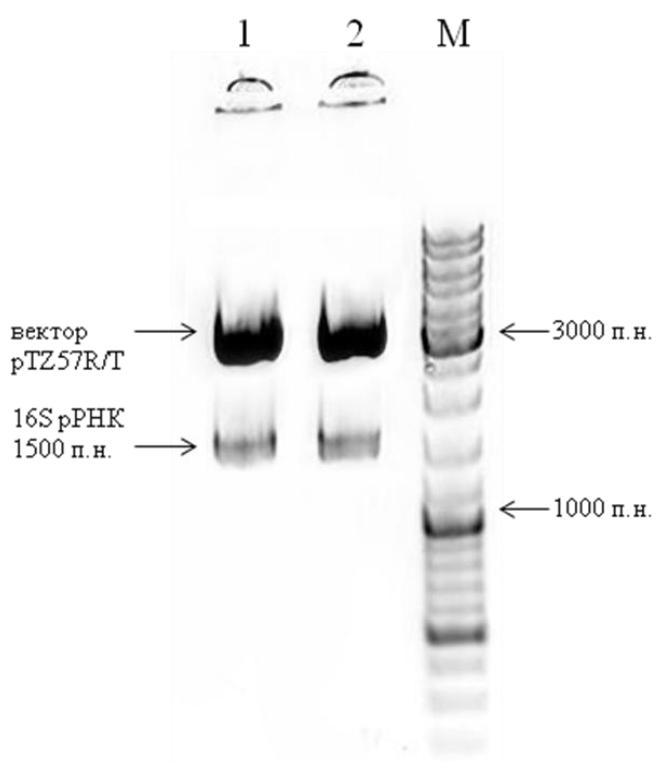


Рис. 4. Анализ результатов рестрикционного расщепления плазмидной ДНК при помощи электрофореза в 0,8% агарозном геле. 1–2 — анализируемые пробы, М — ДНК-маркер GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Sigma, США)

Таблица 10. Рестриктазы, используемые в работе

Рестриктаза	Сайт узнавания	Источник	Буферный раствор
EcoR1	G ^A AATT C C TTA ^A ^G	Штамм <i>E. coli</i> , несущий клонированный ген <i>ecoR1R</i> из <i>Escherichia coli</i> RY13	Buffer EcoR1 или Buffer Tango
BamH1	G ^G GATC C C CTAG ^G C	Штамм <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	Buffer BamH1 или Buffer Tango

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК — СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Принцип автоматического секвенирования ДНК заключается в электрофоретическом разделении флуоресцентно меченых продуктов специфически терминированных секвенирующих реакций и их детекции в режиме реального времени (Inoue et al., 1998). Детекция осуществляется в нижней части геля, где в момент прохождения фрагментов ДНК происходит возбуждение молекул красителя лазерным лучом. Разделение проводят с помощью специальных приборов — автоматических секвенаторов ДНК. Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан в 1987 г. фирмой Applied Biosystems (США).

Автоматические секвенаторы ДНК управляются специально созданными компьютерными программами. Так, например, приборы фирмы Applied Biosystems комплектуются программами сбора и анализа данных. После завершения электрофоретического разделения предварительные данные, собранные программой Data Collection, подвергаются анализу с помощью специальной программы. При этом определяется относительная высота пиков, соответствующих фрагментам ДНК, терминированным тем или иным типом нуклеотидного основания, и ликвидируются некоторые погрешности (Alphey, 1997).

В автоматическом секвенировании ДНК для разделения флуоресцентно меченых продуктов терминирующих реакций, кроме электрофореза в стандартных пластинах поликарбамидного геля, широко используется капиллярный гель-электрофорез (Sambrook, 2001). Для него характерны высокая чувствительность и высокая скорость разделения, являющиеся следствием крайне малого внутреннего диаметра самого капилляра. В ранних работах по секвенирующему капиллярному электрофорезу гелевым матриксом служил обычный поликарбамидный гель (Lario et al., 1997). Однако его нестабильность, формирование пузырьков воздуха, видимых при микроскопическом исследовании капилляров, заметно снижали производительность метода. Применение линейного поликарбамида позволило снять эти проблемы и способствовало развитию данного метода (Inoue et al., 1998).

Постановка асимметричной ПЦР-амплификации в присутствии флуоресцентно меченых терминирующих нуклеотидов (реакция секвенирования)

ДНК-секвенирование проводится с использованием стандартных праймеров M13/pUC(-20) или T7 (Таблица 13) на автоматическом

секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Watts, 2001). Праймеры синтезировала компания Синтол (Россия). Компоненты реакционной смеси для ПЦР-стадии реакции секвенирования показаны в таблице 11. Режим термоциклира для ПЦР-стадии реакции секвенирования показаны в таблице 12.

Таблица 11. Состав реакционной смеси для ПЦР-стадии реакции секвенирования

Компоненты реакции	Объем, мкл
2,5X Ready Reaction Premix	0,5
TMS Buffer 5X	3,75
3,3 мкМ Праймер	1
Плазмидная ДНК	1
Бидистиллированная вода	13,75
Конечный объем реакции	20

Таблица 12. Режим температурного циклирования при проведении реакции секвенирования

Температура	Время	Описание этапа	
96 °C	1 мин	предварительный нагрев	
96 °C	10 сек	денатурация	
55 °C	50 сек	отжиг	
60 °C	4 мин	синтез	
10 °C		хранение	35 циклов

Таблица 13. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных при ДНК-секвенировании

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
Праймер промоторного участка Т7 для секвенирования	TAATACGACTCACTATAGGG
M13/pUC (-20) прямой праймер для секвенирования	GTAAAAACGACGGCCAGTG

В качестве буфера для ПЦР амплификации клонированных фрагментов применяют 5X TMS Buffer (400 мМ Трис pH 9,0, 10 мМ MgCl₂).

Очистка фрагментов ПЦР-амплификации

1. Добавьте в пробирки с ПЦР-фрагментами по 2 мкл 125 мМ ЭДТА, 2 мкл 3М ацетата натрия и 70 мкл 95% этанола.
2. Инкубируйте смесь при комнатной температуре в течение 15 минут, затем смесь перемешайте на вортексе.
3. Инкубируйте смесь 30 минут при -20 °C.
4. Центрифугируйте 20 минут при 13,3 тыс. об/мин.
5. Аккуратно отберите и отбросьте микропипеткой надосадочную жидкость.
6. К осадку добавьте 100 мкл 70% этанола и 5 минут центрифугируйте при 13,3 тыс. об/мин.
7. Отбросьте надосадочную жидкость и сушите пробирки в термостате при 37 °C с открытыми крышками.
8. После испарения остатков надосадочной жидкости добавьте 20 мкл H₂O Di формамида.
9. Полученную смесь перемешайте на вортексе в течение 20 секунд.
10. Смесь в пробирке загрузите в термоциклер с параметрами SeqPrep:
 - Нагревание до 95 °C в течение 2 минут;
 - Охлаждение до 4 °C для хранения.
11. Выгрузив пробирку с пробой из термоцикlera, осадите капли со стенок кратковременным (20 секунд) центрифугированием и перенесите пробу в специальные пробирки с септами для секвенирования.

Результаты секвенирования обработать программным пакетом Lasergene 5.03 (DNA STAR, Inc., США). Для анализа секвенсных хроматограмм используется программа SeqMan.

В качестве примера на рисунке 5 показан анализ секвенсной хроматограммы одного образца с помощью программы SeqMan.

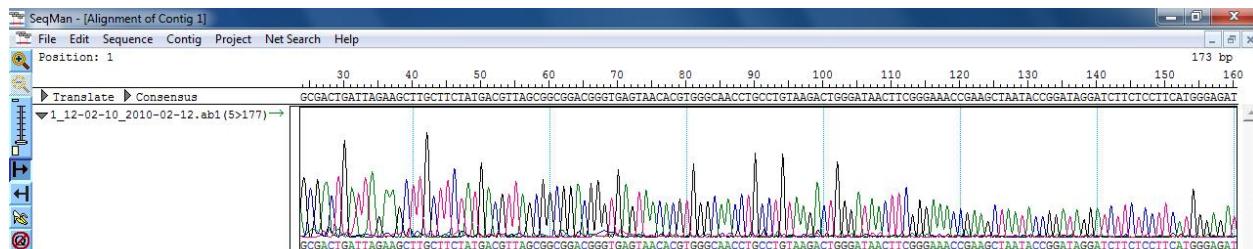


Рис. 5. Анализ секвенсной хроматограммы одного образца с помощью программы SeqMan

Определенная первичная нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК микробного изолята (длина 400 п.н., GenBank HM748429):

atcgggtctatacatgcagtcgagcgactgattagaagcttgcctatgacgttagcggcggacgggtgagtaa
cacgtggcaacctgcctgtaagactggataactcggaaaccgaagctaataccggataggatcttccttc
ggagatgattgaaagatggttcgctatcactacagatggcccggtgcattagcttagttggtgaggtaacgg
accaaggcaacgatgcatagccgacctgagagggtgatcggccacactggactgagacacggccc
gggaggcagcagtaggaaatctccgcaatggacaaaagtctgacggagcaacgccggtgagt
gggtcgtaaaact.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОРГАНИЗМА НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА ПЕРВИЧНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Идентификацию микроорганизмов на основании анализа первичной нуклеотидной последовательности обычно проводят в базе данных GenBank/EMBL/DDBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с помощью множественного выравнивания в программе BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

BLAST (англ. *Basic Local Alignment Search Tool*) — алгоритм, позволяющий проводить сравнение первичных нуклеотидных и белковых последовательностей. Компьютерные программы на основе алгоритма BLAST позволяют проводить поиск гомологов белков или нуклеиновых кислот, для которых известна первичная структура (последовательность) или её фрагмент, в соответствующих базах данных (Altschul et al., 1990).

Программы серии BLAST

Существует 3 основных подхода для анализа биологических последовательностей:

Анализ нуклеотидных последовательностей. Набор алгоритмов, позволяющих работать с последовательностями нуклеотидов ДНК или РНК. **Blastn** («Nucleotide BLAST») позволяет сравнивать нуклеотидные последовательности с различными базами данных и осуществлять поиск гомологичных последовательностей. Анализ с помощью blastn занимает больше времени по сравнению с другими алгоритмами, но позволяет проводить сравнение последовательностей с низкой гомологией. **Megablast** предназначен для быстрого сравнения близкородственных нуклеотидных последовательностей с идентичностью более 95%. Программа объединяет многочисленные нуклеотидные последовательности в единую последовательность и затем проводит поиск баз данных BLAST. Затем megablast проводит обработку полученных данных для сравнения индивидуальных последовательностей и статистической обработки.

Программа **discontiguous megablast** позволяет игнорировать некоторые нуклеотиды в последовательности, допуская некоторые несоответствия, и предназначена для сравнения дивергировавших последовательностей, обладающих незначительным сходством — например при межвидовом сравнении.

Анализ белковых последовательностей. Набор алгоритмов, позволяющих работать с аминокислотными последовательностями белков. Стандартный **Blastp** («Protein BLAST») позволяет проводить сравнение аминокислотных последовательностей с различными базами данных и осуществлять поиск гомологичных последовательностей. Как и другие программы семейства Blast, **Blastp** находит локальные гомологичные участки. С помощью данного алгоритма можно идентифицировать аминокислотные последовательности и находить гомологи в базах данных белковых последовательностей. Алгоритм **psi-blast** («Position-Specific Iterated BLAST») является наиболее чувствительным алгоритмом анализа белковых последовательностей, что делает его полезным для нахождения дальних родственных белков или новых членов семейств белков — дивергировавших последовательностей, обладающих незначительным сходством. Данный алгоритм обычно применяют, когда стандартный алгоритм **Blastp** не находит гомологичных последовательностей или выдаёт ссылки на гипотетические белки («hypothetical protein») или формулировки схожести с определёнными последовательностями («similar to...»). **Phi-blast** («Pattern-Hit Initiated BLAST») предназначен для поиска белков, которые содержат заданный пользователем шаблон (паттерн), и одновременно содержат последовательности, гомологичные запросу пользователя, в непосредственной близости от заданного шаблона. Это двойное требование призвано сократить количество хитов в базах данных, которые содержат шаблон, но, скорее всего, не имеют истинной гомологии с анализируемой последовательностью. Алгоритм **cdart** («Protein homology by domain architecture») исследует структуру доменов белков. Он позволяет анализировать доменную структуру всех белков в базе данных *theprotein nr* и проводит поиск белков, содержащих схожие консервативные домены.

Анализ транслированных последовательностей. Специальные программы позволяют транслировать нуклеотидные последовательности в аминокислотные. **Blastx** («Translated query vs protein database») сначала проводит трансляцию нуклеотидных последовательностей в аминокислотные последовательности, а затем проводит поиск гомологичных последовательностей в базах данных белков. **Blastx** проводит трансляцию и анализ всех 6 рамках считывания нуклеотидной последовательности. Это

позволяет эффективно проводить анализ неизвестных последовательностей, или последовательностей, содержащих ошибки секвенирования, которые могли бы привести к сдвигу рамок считывания или другим ошибкам трансляции. Таким образом, алгоритм часто используют для анализа *de novo* секвенированных нуклеотидных последовательностей и для анализа EST-последовательностей («Expressed Sequence Tags»). Этот алгоритм является более чувствительный по сравнению со стандартным нуклеотидным **Blast** поскольку сравнение выполняется на уровне белковых последовательностей. С другой стороны, алгоритм **tblastn** («Protein query vs translated database») наоборот позволяет проводить поиск белковых последовательностей в неаннотированных базах данных нуклеотидных последовательностей. Анализ также проводится во всех 6 рамках считывания и особенно полезен для поиска гомологичных белков в базах данных EST и HTG (Draft Genome Records — черновые варианты геномов). И наконец, алгоритм **tblastx** («Translated query vs translated database») полезен для идентификации новых генов в нуклеотидных последовательностях, потенциально содержащих неточности. Алгоритм транслирует нуклеотидные последовательности во всех 6 рамках считывания и проводит сравнение с результатами трансляции по 6 рамкам считывания баз данных нуклеотидных последовательностей.

С помощью различных алгоритмов BLAST можно проводить анализ нуклеотидных последовательностей в базах данных геномов различных организмов: позвоночных (человек, мышь, макака и др.), беспозвоночных (дрозофилы, *C. elegans* и др.), растений (арабидопсис, кукуруза и др.), бактерий (кишечная палочка, сенная палочка и др.), грибов (аспиргилл, дрожжи и др.) и вирусов.

Множественное выравнивание с помощью программы Blastn

1. Зайдите на сайт программы BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

При открытии главной страницы BLAST вверху есть главное меню с четырьмя вкладками:

- Home — вкладка для возврата на домашнюю страницу BLAST с любой другой страницы (BLAST home page); Находящаяся под ней выделенная строка — дает переход к новостям, и основным событиям дня, которые изменяются периодически.
- Recent Results — вкладка для открытия результатов поисков, которые Вы совершили в последние 36 часов;

- Saved Strategies — вкладка для перехода к сохраненным Вами поисковым запросам на вашей личной страничке «My NCBI» (надо зарегистрироваться);
- Help — вкладка для перехода в каталог с документацией по работе с программой BLAST.

2. Для сравнения нуклеотидных последовательностей, на главной странице BLAST выберете тип программы «nucleotide blast» в графе Basic Blast (Рис. 6).

3. В окно для ввода последовательности Enter Query Sequence введите последовательность в формате FASTA (Рис. 7). В качестве примера мы используем нуклеотидную последовательность фрагмента гена 16S рРНК микробного изолята GenBank HM748429, нуклеотидная последовательность которого приведена выше по тексту.

4. Выберите параметры Choose Search Set → Others → Nucleotide collection (nr/nt)

5. Выберете в графе Program Selection алгоритм поиска Somewhat similar sequences (blastn)

6. Нажмите на кнопку BLAST внизу страницы для запуска алгоритма.

Результаты анализа представлены на рисунках 8 и 9.

Для определения степени и значимости сходства изучаемой последовательности с последовательностями из базы данных BLAST вычисляет такие показатели как Max ident (максимальная идентичность), Query coverage (область перекрытия запроса) и величину E (expected value, E-value) для каждой пары последовательностей. Величина E (E-value) показывает достоверность данного выравнивания (чем ниже значение E, тем достовернее выравнивание).


BLAST
Basic Local Alignment Search Tool
[Home](#)[Recent Results](#)[Saved Strategies](#)[Help](#)[► NCBI/BLAST Home](#)BLAST finds regions of similarity between biological sequences. [more...](#)[Learn more](#) about how to use the new BLAST design

BLAST Assembled Genomes

Choose a species genome to search, or [list all genomic BLAST databases](#).

- [Human](#)
- [Mouse](#)
- [Rat](#)
- [Arabidopsis thaliana](#)

- [Oryza sativa](#)
- [Bos taurus](#)
- [Danio rerio](#)
- [Drosophila melanogaster](#)

- [Gallus gallus](#)
- [Pan troglodytes](#)
- [Microbes](#)
- [Apis mellifera](#)

Basic BLAST

Choose a BLAST program to run.

[nucleotide blast](#)

Search a **nucleotide** database using a **nucleotide** query
Algorithms: blastn, megablast, discontiguous megablast

[protein blast](#)

Search **protein** database using a **protein** query
Algorithms: blastp, psi-blast, phi-blast

[blastx](#)

Search **protein** database using a **translated nucleotide** query

[tblastn](#)

Search **translated nucleotide** database using a **protein** query

[tblastx](#)

Search **translated nucleotide** database using a **translated nucleotide** query

Specialized BLAST

Choose a type of specialized search (or database name in parentheses.)

- Search [trace archives](#)
- Find [conserved domains](#) in your sequence (cds)
- Find sequences with similar [conserved domain architecture](#) (cdart)
- Search sequences that have [gene expression profiles](#) (GEO)
- Search [immunoglobulins](#) (IgBLAST)
- Search for [SNPs](#) (snp)
- Screen sequence for [vector contamination](#) (vecscren)
- [Align](#) two sequences using BLAST (bl2seq)

Рис. 6. Главная страница BLAST. Рамкой выделена программа blastn для поиска всех сходных нуклеотидных последовательностей

Согласно проведённому анализу, исследуемая нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК микробного изолята GenBank HM748429 может быть идентифицирована как нуклеотидная последовательность *Bacillus megaterium* (ген 16S рРНК, GU048868.1) на основании 100% сходства (максимальная идентичность — 100%, область перекрытия запроса — 100%, E value — 0.0) (Рис. 9). Критической границей степени схожести нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, ниже которой сравниваемые организмы не могут достоверно относиться к одному виду является 97% (Tindall et al., 2010).

BLAST Basic Local Alignment Search Tool My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/ BLAST/ blastn suite

blastn blastp blastx tblastn tblastx

Enter Query Sequence

Enter accession number, gi, or FASTA sequence Clear Query subrange From To

Or, upload file

Job Title Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database Human genomic + transcript Mouse genomic + transcript Others (nr etc.) Nucleotide collection (nr/nt)

Organism Enter organism name or id—completions will be suggested Exclude

Exclude Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.

Entrez Query Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

Optimize for Highly similar sequences (megablast) More dissimilar sequences (discontiguous megablast) Somewhat similar sequences (blastn) Choose a BLAST algorithm

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Blastn (Optimize for somewhat similar sequences) show results in a new window

Algorithm parameters Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with + sign

Copyright | Disclaimer | Privacy | Accessibility | Contact | Send feedback NCBI | NLM | NIH | DHHS

Рис. 7. Страница BLAST для ввода анализируемой нуклеотидной последовательности и выбора параметров поиска. Рамками выделены ключевые элементы страницы

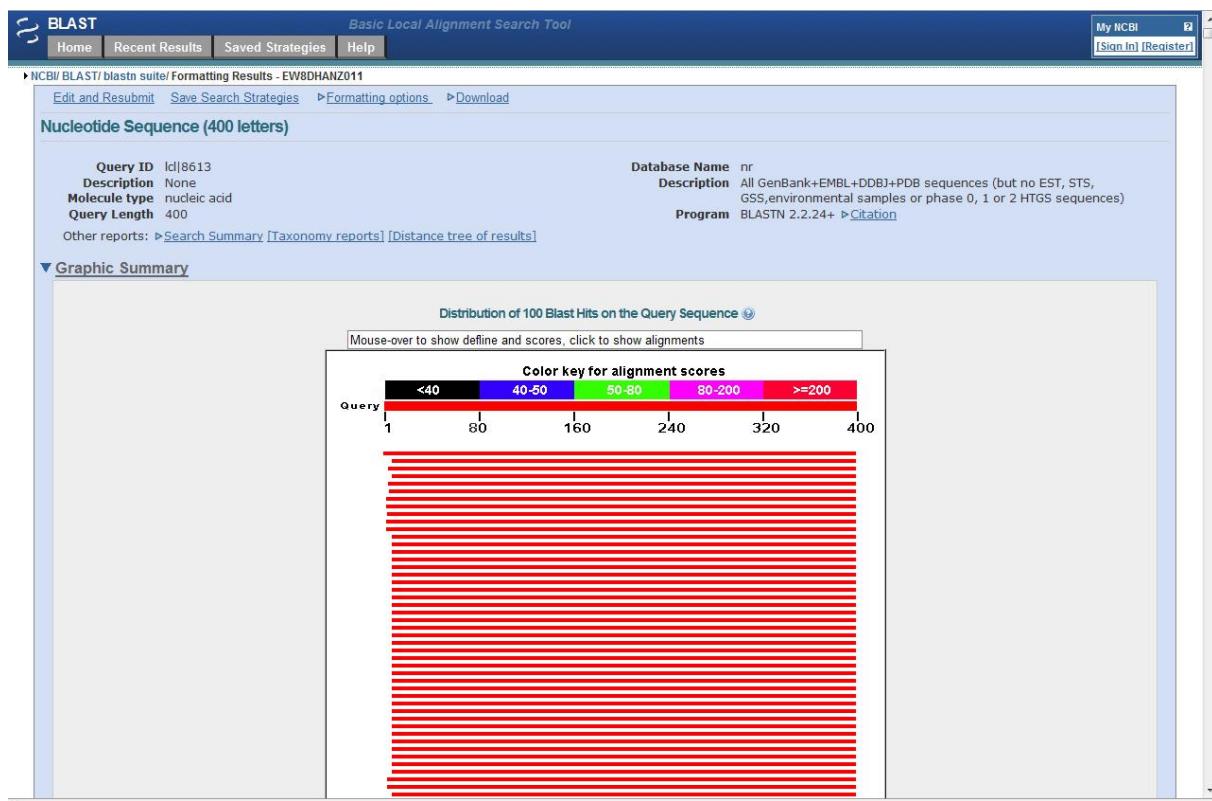


Рис. 8. Графическое представление результатов работы программы BLAST

▼ Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HM748429.1	Bacillus megaterium strain NK1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	722	722	100%	0.0	100%	
HM104474.1	Bacillus megaterium strain AIMST Efe1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	704	704	98%	0.0	99%	
GU048868.1	Bacillus megaterium strain TOBCMUDU-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	704	704	99%	0.0	99%	
FN423777.1	Bacillus megaterium partial 16S rRNA gene, strain endo12	704	704	98%	0.0	99%	
AM882690.1	Bacillus sp. V20 partial 16S rRNA gene, strain V20	704	704	99%	0.0	99%	
HM054478.1	Bacillus sp. JSM 081022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	702	702	98%	0.0	99%	
Q0169805.1	Bacillus sp. B1408 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	700	700	99%	0.0	99%	
EU979526.1	Bacillus megaterium strain TS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	700	700	99%	0.0	99%	
FM202726.1	Bacillus sp. CS8 partial 16S rRNA gene, strain CS8	700	700	99%	0.0	99%	
EU809476.1	Bacillus sp. C-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	700	700	99%	0.0	99%	
EU596422.1	Bacillus sp. W28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	700	700	99%	0.0	99%	
HQ231223.1	Bacillus sp. NYz44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
HQ003448.1	Bacillus sp. NBDG33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
HM462435.1	Bacillus megaterium strain Pta-I-str2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
HM567144.1	Bacillus sp. DU87(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
HM567120.1	Bacillus sp. DU63(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
HM567004.1	Bacillus sp. DU123(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
HM566700.1	Bacillus sp. SGE174(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
HM566666.1	Bacillus sp. SGE139(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
HM566664.1	Bacillus sp. SGE135(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
HM566656.1	Bacillus sp. SGE128(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
HM566621.1	Bacillus sp. SC89(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
FN692034.1	Bacillus sp. HY 1.1 partial 16S rRNA gene, strain HY 1.1	699	699	98%	0.0	99%	
HM051238.1	Bacillus megaterium strain SII-1a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
HM104462.1	Bacillus sp. B2(2010b) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
HM027880.1	Bacillus megaterium strain RJK 600 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
AB536937.1	Bacillus sp. MB108 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
GU122952.1	Bacillus megaterium strain DBT2TS2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
GU122960.1	Bacillus megaterium strain DBTBIG 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
Q9985503.1	Bacillus megaterium strain MC-3-SDCH4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
Q927173.1	Bacillus megaterium strain Z3-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
Q502512.1	Uncultured Firmicutes bacterium clone Cf4-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
Q019972.1	Bacillus sp. 210_20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
FJ976559.1	Bacillus megaterium strain LCR50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
FJ976554.1	Bacillus megaterium strain LCR45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
FJ976552.1	Bacillus megaterium strain LCR43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	
FJ976550.1	Bacillus megaterium strain LCR41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	699	699	98%	0.0	99%	

Готово

Рис. 9. Текстовое представление результатов работы программы BLAST

Учитывая, что в нашем примере сравнение происходит лишь по частично определенной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, мы достоверно можем говорить лишь о родовой принадлежности организма, в данном случае род *Bacillus*, а сам организм, идентифицированный таким образом, будет называться *Bacillus sp.*

Для более точной идентификации организма необходимо использовать другие программы и проводить множественное выравнивание с базой данных по нуклеотидным последовательностям полного гена 16S рРНК. В случае схожести менее 97% при сравнении полного гена 16S рРНК исследуемый организм можно считать новым видом, для которого потребуются дополнительные фенотипические и биохимические тестирования (Tindall et al., 2010).

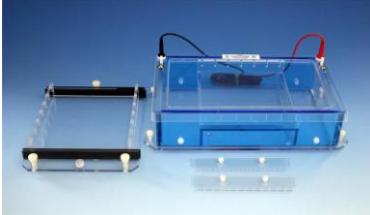
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ РЕАГЕНТОВ

Реагент	Производитель
10X <i>Taq</i> -буфер	Силекс, Россия www.sileks.com
25 мМ MgCl ₂	
10 мкМ 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты	
<i>Taq</i> -полимераза 5 ед/мкл	
20 мкМ Универсальный прокариотический прямой праймер 16S-8F (прямой)	Синтол, Россия www.syntol.ru
20 мкМ Универсальный прокариотический обратный праймер 16S-1492R (обратный)	
20 мкМ Вектор-специфичный прямой праймер pUC/M13 Forward	
20 мкМ Вектор-специфичный обратный праймер pUC/M13 Reverse	
ДНК-маркер <i>DirectLoadTM Wide Range DNA Marker</i>	SIGMA, США www.sigmadrich.com
Агароза	
ЭДТА	
Набор для выделения ДНК из агарозного геля <i>DNA Extraction Kit #K0S13</i>	Fermentas International Inc., Канада www.fermentas.com
Фермент ДНК-лигаза T4	
Буфер 10X T4 ДНК-Лигазы	
Плазмида (вектор) PTZ57R T	
Набор для выделения плазмидной ДНК <i>Fermentas Gene JETTM Plasmid Miniprep Kit # K0502</i>	BioBasic Inc., Китай www.biobasic.com
Набор для выделения ДНК из агарозного геля <i>EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit</i>	
Набор для выделения плазмидной ДНК <i>Roche High Pure Plasmid Isolation Kit</i>	
Фермент EcoRI	Roche Applied Science, Германия www.roche-applied-science.com
Фермент BamHI	
Буфер 10x React Buffer O	

Триптон	Amresco, США www.amresco-inc.com
Дрожжевой экстракт, без содержания солей, тип Д	
Hi-Di формамид	Applied Biosystems, США www.appliedbiosystems.com
2,5X Ready Reaction Premix	
Ацетат натрия	Helicon, Россия www.helicon.ru
Хлорид магния $MgCl_2$	
Глицерол	
Ампициллин	
Тетрациклин	
Хлорид кальция $CaCl_2$	
Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane	
Уксусная кислота	
Бромистый этидий <i>Ethidium Bromide</i>	
Натрий хлорид $NaCl$	
Агар	Promega Corporation, США www.promega.com
pGEM [®] -T Easy	
IPTG	
X-GAL	USBiological, США www.usbio.net
Парафильм <i>Parafilm[®] M</i>	Alcan Packaging, США www.alcanpackaging.com

СПИСОК ПРИБОРОВ

Название прибора	Фотография	Производитель, ссылка на сайт
Вортекс <i>Multi-Vortex V-32</i>		<i>BIOSAN, Латвия</i> www.biosan.lv
Термоблок <i>Thermo Block TDB-120</i>		<i>BIOSAN, Латвия</i> www.biosan.lv
Микроцентрифуга <i>Heraeus Pico 17 centrifuge</i>		<i>Thermo electron corporation, Германия</i> www.thermo.com
Термоциклер <i>MJ Mini Personal Thermal Cycler</i>		<i>Bio-RAD, Сингапур</i> www.bio-rad.com
Трансиллюминатор <i>UV Transilluminator TFP-MWL</i>		<i>Vilber lourmat, Франция</i> www.vilber.com

<p>Система регистрации результатов электрофореза <i>Gel Imager GI-2</i></p>		<p><i>Helicon, Россия</i> www.helicon.ru</p>
<p>Водяная баня <i>TW-2.03</i></p>		<p><i>ELMI, Латвия</i> www.medinst.ru</p>
<p>Автоматический секвенатор <i>ABI Prism 310 Genetic Analyzer</i></p>		<p><i>Applied Biosystems, США</i> www.appliedbiosystems.com</p>
<p>Ванна для электрофореза <i>Submarine/Horizontal Gel Electrophoresis System 14cm (w) x 20cm(l)</i></p>		<p><i>CBS Scientific Company, США</i> www.cbsscientific.com</p>

ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырева, М.Н. Генодиагностика заболеваний: качественный и количественный подходы / М.Н. Болдырева // Цитокины и воспаление. – 2005. – №3. – С.40-41.
2. Грант, В. Эволюция организмов / В. Грант. – М.: Мир, 1980. – 408 с.
3. Саики, Р. Полимеразная цепная реакция / Р. Саики, У. Гиленстен, Г. Эрлих //Анализ генома: Методы / Пер. с англ., под ред. К. Дейвиса. М.: Мир, 1990. – С.176-190.
4. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
5. Остреман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остреман. – М.: Наука, 1996. – 288 с.
6. Рыбчин, В.Н. Основы генетической инженерии. 2-е изд., перераб. И доп.: Учебник для вузов / В.Н. Рыбчин. – СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2002. – 522 с.
7. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ., пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.
8. Alphey, L. DNA sequencing from experimental methods to bioinformatics / L. Alphey. – Berlin etc.: BIOS sci. publ., 1997. – 224 p.
9. Altschul, S.F. Basic Local Alignment Search Tool / S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman // J Mol Biol. – 1990. – V.215. – P.403-410.
10. Cohen, S. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. / S. Cohen, C. Changa, L. Hsu. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1972. – V.69. – P.2110-2114.
11. Dretzen, G. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels / G. Dretzen, M. Bellard, P. Sassone-Corsi, P. Chambon // Anal. Biochem. – 1991. – V.112. – P.295-298.
12. Inoue, H. Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise of electric field strength / H. Inoue, M. Tsunako, Y. Baba // Chromotogr. – 1998. – V.802. – P.179-184.
13. Kwok, S. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection / S. Kwok, D.H. Mack, K.B. Mullis et al. // Virol. – 1987. – V.61, №5. – P.1690-1694.

14. Girvitz, S.C. A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels / S.C. Girvitz, S. Bacchetti, A.J. Rainbow, F.L. Graham // Anal. Biochem. – 1990. – V.106. – P.492-496.
15. Mullis, K.B. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction / K.B. Mullis, F.A. Faloona // Meth. Enzymol. – 1987. – V.155. – P.335-350.
16. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 1626 p.
17. Scharf, S.J. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences / S.J. Scharf, G.T. Horn, H.A. Erlich // Science. – 1986. – V.233, №4768. – P.1076-1078.
18. Tindall, B.J. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purpose / B.J. Tindall, R. Rossello-Mora, H.-J. Busse, W. Ludwig, P. Kämpfer // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2010. – V. 60. – P.249-266.
19. Watts, D. Automated fluorescent DNA sequencing on the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer / D. Watts, J.R. MacBeath // Methods Mol. Biol. – 2001. – V.167. – P.153-170.
20. Weisburg, W.G. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study / W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pelletier, D.J. Lane // Bacteriol. – 1991. – V.173. – P.697-703.
21. Wong, C. Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA / C. Wong, C.E. Dowling, R.K. Saiki et al. // Nature. – 1987. – V.330, №6146. – P.384-386.