МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

ФАКУЛЬТЕТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ

КАФЕДРА БИОЛОГИИ ПОЧВ

Н. А. Манучарова

Молекулярно-биологические методы в почвоведении и экологии

Рекомендовано Учебно-методическим Советом по почвоведению при УМО классических университетов России в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению «Почвоведение» – 0219000

Москва

«Университетская книга»

2014

УДК 631.4:577.4:502.7(075.8)
ББК 40.3я7
М23

Ответственный редактор
доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН *И.Ю.Чернов*

Рецензенты:
доктор биологических наук, профессор *Судницын И. И.*
доктор биологических наук, профессор *Терехова Л. П.*

Манучарова Н. А.

М23 Молекулярно-биологические методы в почвоведении и экологии : учебное пособие / Н. А. Манучарова. — М.: «Университетская книга», 2014. — 68 с.: табл., ил.

ISBN 978-5-91304-341-2

В пособии изложены принципы и методические аспекты применения молекулярных методов для исследования биологических объектов природных экосистем. Обсуждаются вопросы определения биоразнообразия микробного прокариотного комплекса, находящегося в метаболически активном состоянии в исследуемых системах.

Для студентов, аспирантов, преподавателей и научных работников, специализирующихся в области почвенной микробиологии, агрохимии, почвоведении, экологии.

УДК 631.4:577.4:502.7(075.8)
ББК 40.3я7

Учебное пособие издано при финансовой поддержке Гранта РФФИ № 13-04-00269

ISBN 978-5-91304-341-2

© Манучарова Н. А., 2014
© Изд-во «КДУ», обложка, 2014

Введение

Молекулярная экология – это новая стратегия изучения разнообразия организмов в природных сообществах. Исследования в этом направлении призваны ответить на следующие основные вопросы: 1. Какова структура сообщества в исследуемом ареале (участок суши, пресноводный бассейн, участок морской или океанической акватории и т.п.). 2. Меняется ли структура сообщества в исследуемом ареале под воздействием тех или иных причин и каким образом. 3. Меняются ли взаимоотношения между участниками сообщества в процессе изменения структуры сообщества, в чем состоят эти изменения. 4. Как происходит обмен генетическим материалом между участниками экосистемы, имеет ли место так называемый горизонтальный перенос генетической информации. Ответ на последний вопрос особенно важен в связи с широким распространением в природных сообществах генетически модифицированных микроорганизмов.В последние годы систематика и филогения организмов строятся все чаще на различиях в структуре генома и переходят в область геносистематики, основанной на новейших достижениях молекулярной биологии. Появление и усовершенствование различных методов молекулярной биологии (гибридизационного анализа, секвенирования, денатурирующего градиентного гель электрофореза, молекулярного клонирования и полимеразной цепной реакции) привели к созданию методологии молекулярной экологии. Использование описываемых в пособии молекулярно-биологических методов дает возможность расширить имеющиеся представления о микробном разнообразии в природных субстратах. Стало возможным изучение биоразнообразия на основании анализа отдельных элементов их генетического материала без выделения отдельных микроорганизмов в чистую культуру (*Нетрусов и др., 2004*). В связи с этим возможным становится учет, так называемых, «некультивируемых форм» бактерий – не способных расти в лабораторных условиях, составляющих подавляющую часть микробных сообществ.

Масштабы объектов молекулярной биологии могут быть самые разные: от слона до невидимого невооруженным глазом организма, при этом *объектом молекулярных методов анализа* является молекула ДНК или РНК. Следовательно, исходным этапом всех молекулярно-генетических методов является получение образцов ДНК. Источником геномной ДНК (матрицы) могут быть субстраты различной природы (растворы: плазма крови, речная или морская вода, суспензии (почва), клеточная биомасса). Возможность проведения молекулярно-генетического анализа с небольшим количеством легкодоступного биологического материала является методическим преимуществом методов данной группы. Выделенная ДНК одинаково пригодна для проведения различных исследований и может долго сохраняться в замороженном виде.

Глава 1. Выделение ДНК (РНК) из биологического материала

На данной стадии проведения анализа проба подвергается специальной обработке, в результате которой происходит лизис клеточного материала, удаление белковых и полисахаридных фракций, и получение раствора ДНК или РНК, свободной от ингибиторов и готовой для дальнейшей амплификации. Выбор методики выделения ДНК (РНК) в основном определяется характером обрабатываемого материала.

В случае выделения генетического материала из растворов (плазмы крови, водные образцы) проблема выделения нуклеиновых кислот решается проще: клетки выделяют фильтрованием (или центрифугированием) и затем лизируют с последующей экстракцией ДНК фенолом и хлороформом.

Сложнее обстоит дело с выделением ДНК из природных суспензий типа почвенной. Проблема состоит в том, что никогда нельзя сказать, насколько полно извлечены нуклеиновые кислоты из образца окружающей среды. Культивирование клеток не дает представления об этом, поскольку в культуру удается перевести по разным оценкам лишь от 1 до 20% микроорганизмов, находящихся в исследуемом образце. Существенная доля организмов, находящихся в почве, относится к некультивируемым формам.

Широко используются два изначально различных подхода выделения ДНК **прямой лизис in situ** и **извлечение клеток с последующим лизисом** (*van Elsas J.D. et all, 1998).*

Прямая экстракция ДНК из почв применима к различным почвам и дает выход ДНК чаще всего в диапазоне от 10 до 30 мкг/г почвы. Следует, однако, иметь в виду, что ДНК может адсорбироваться на почвенных частицах, что приводит к снижению количества выделяемой ДНК (*Frostergard et al, 1999*). При этом выход колеблется в зависимости от состава почвы (содержания илистой фракции), так что необходимо подбирать условия эксперимента для данной конкретной почвы. Еще одной проблемой, возникающей при непосредственном выделении ДНК из почвенного образца, является большое количество гуминовых кислот, загрязняющих получаемые препараты ДНК (*Tebbe et al, 1993*).

Методы так называемой "прямой экстракции" нуклеинового материала из образцов подвергают клетки непосредственному разрушению - комбинацией обычных процедур: замораживание-оттаивание, детергентный лизис, механическое (ударное) разрушение. При этом разрушаются и эндоспоры. Мелкие клетки более устойчивы к лизису. Считается, что такого рода обработки приводят к извлечению до 96% нуклеинового материала, а длительные многократные обработки позволяют извлекать 99,8% этого материала. Однако всегда остается открытым вопрос, насколько эти оценки близки к истине, поскольку содержание нуклеотидного материала в образце неизвестно.

Непрямая экстракция ДНК с предварительным извлечением клеток весьма существенно зависит от способа экстракции микробных клеток из почвы. Сущность процедуры сводится к отделению клеток от частиц почвы с последующим разрушением клеток путем обработки шариками, детергентом, экстракцией фенолом, фенол-хлороформной смесью и далее - стандартными приемами очистки нуклеиновых кислот и разделения на фракции РНК и ДНК. Выход ДНК и рРНК составляет 15-30 и 0,25-1,0 мкг/г почвы, соответственно.

Получение генетического материала всегда включает в себя стадии чередования охлаждения и нагревания исследуемого образца с последующим центрифугированием. Такая особенность методики связана с лучшей десорбцией клеток с поверхности почвенных частиц при смене температур.

Для отделения бактериальных клеток от элементов почвы и удаления органических примесей, в частности гуминовых кислот, чаще всего используются следующие буферы: фосфатный – он наиболее способствует десорбции клеток с почвенных частиц, ТЕ-буфер (трисHCl и ЭДТА (этилендиаминтетроуксусная кислота)) наиболее часто используют при выделении ДНК из бактериальных клеток, буфер ТЕ + поливинил пиролидоном (PVPP) и SDS, а так же буфер ТЕ + цетавлон. Последние два буфера эффективно удаляют органические вещества, содержащие гумусовые компоненты (*Запороженко и др., 2006*).

В последнее время широкое применение получило использование, так называемых, «китов» (наборов соответствующих буферов) для получения тотального ДНК из исследуемых субстратов. Ниже приводятся модифицированные нами протоколы коммерческих препаратов для выделения тотальной ДНК из почв, а так же из клеточной биомассы.

1.1. **Выделение ДНК из почвенных образцов с помощью PowerSoil DNA Kit (MO BIO)**

Примечание: все операции производить в резиновых перчатках

1. Поместите образец почвы весом 0.25грамм в 2-мл пробирку **Bead Solution,** содержащую лизирующий буфер (SDS) и стеклянные шарики**.**
2. Встряхните на вортексе в течение нескольких минут.
3. Добавьте 60 мкл **раствора C1** и несколько раз переверните пробирку (можно несколько секунд встряхнуть на вортексе)
4. Убедитесь, что **раствор** не выпал в осадок. Если это все же произошло, нагрейте раствор до 60º и продолжайте нагревать, пока осадок не растворится.
5. Закрепите пробирки **Bead Solution** в вортексе и встряхивайте 10 мин на максимальной скорости.
6. Открутите пробирки в течение 30 с. на 10 000 g при комнатной температуре. **Внимание:** скорость вращения не должна превышать 10 000 g, иначе пробирки могут лопнуть. Пробирки в центрифуге не должны касаться друг друга и вращаться свободно.
7. Перенесите супернатант в чистую микроцентрифужную пробирку (входит в набор). **Примечание:** для образца почвы весом 0.25 грамм получается 400-450 мкл супернатанта (в зависимости от типа почвы). На этом этапе супернатант ещё может содержать почвенные частицы.
8. Добавьте 250 мкл **раствора C2** и встряхните на вортексе в течение 5 секунд. Инкубируйте 5 минут при 4º.
9. Открутите пробирки 1 минуту на 10 000 g.
10. Перенесите весь супернатант в чистую микроцентрифужную пробирку (входит в набор), не касаясь осадка.
11. Добавьте 200 мкл **раствора C3** и встряхните на вортексе в течение нескольких секунд. Инкубируйте 5 минут при 4º.
12. Открутите пробирки 1 минуту на 10 000 g.
13. Не касаясь осадка, перенесите супернатант (не более 750 мкл) в чистую микроцентрифужную пробирку (входит в набор).
14. Добавьте к супернатанту 1.2 мл **раствора C4** и встряхните на вортексе в течение 5 секунд.
15. Перенесите примерно 675 мкл супернатанта на колонку с фильтром и открутите 1 минуту на 10 000 g. Слейте жидкость, добавьте следующую порцию супернатанта и открутите 1 минуту на 10 000 g. Повторяйте, пока весь супернатант не пройдет через фильтр. **Примечание:** для каждого образца требуется в сумме три крутки.
16. Добавьте 500 мкл **раствора C5** и открутите на 10 000 g в течение 30 с.
17. Слейте образовавшуюся жидкость.
18. Снова открутите пробирки 1 минуту на 10 000 g.
19. Осторожно перенесите колонку с фильтром в чистую микроцентрифужную пробирку (входит в набор). Проследите, чтобы **раствор C5** не попал на колонку.
20. Добавьте 100 мкл **раствора C6 без ЭДТА** (либо стерильную воду для ПЦР) в центр белой мембраны фильтра.
21. Открутите на 10 000 g в течение 30 с.
22. Колонка утилизируется, а в пробирке находится ДНК, пригодная для дальнейших экспериментов. Дополнительная обработка или очистка не требуется. Выделенную ДНК хранить при -20º.

Необходимое оборудование:
- микроцентрифуга (до 10 000 g)
- дозатор (50-500 мкл)
- вортекс
- резиновые перчатки

1.1. Выделение ДНК из почвенных образцов с помощью PowerSoil DNA Kit (MO BIO)

Примечание: все операции производить в резиновых перчатках

1. Поместите образец почвы весом 0.25грамм в 2-мл пробирку **Bead Solution,** содержащую лизирующий буфер (SDS) и стеклянные шарики**.**
2. Встряхните на вортексе в течение нескольких минут.
3. Добавьте 60 мкл **раствора C1** и несколько раз переверните пробирку (можно несколько секунд встряхнуть на вортексе)
4. Убедитесь, что **раствор** не выпал в осадок. Если это все же произошло, нагрейте раствор до 60º и продолжайте нагревать, пока осадок не растворится.
5. Закрепите пробирки **Bead Solution** в вортексе и встряхивайте 10 мин на максимальной скорости.
6. Открутите пробирки в течение 30 с. на 10 000 g при комнатной температуре. **Внимание:** скорость вращения не должна превышать 10 000 g, иначе пробирки могут лопнуть. Пробирки в центрифуге не должны касаться друг друга и вращаться свободно.
7. Перенесите супернатант в чистую микроцентрифужную пробирку (входит в набор). **Примечание:** для образца почвы весом 0.25 грамм получается 400-450 мкл супернатанта (в зависимости от типа почвы). На этом этапе супернатант ещё может содержать почвенные частицы.
8. Добавьте 250 мкл **раствора C2** и встряхните на вортексе в течение 5 секунд. Инкубируйте 5 минут при 4º.
9. Открутите пробирки 1 минуту на 10 000 g.
10. Перенесите весь супернатант в чистую микроцентрифужную пробирку (входит в набор), не касаясь осадка.
11. Добавьте 200 мкл **раствора C3** и встряхните на вортексе в течение нескольких секунд. Инкубируйте 5 минут при 4º.
12. Открутите пробирки 1 минуту на 10 000 g.
13. Не касаясь осадка, перенесите супернатант (не более 750 мкл) в чистую микроцентрифужную пробирку (входит в набор).
14. Добавьте к супернатанту 1.2 мл **раствора C4** и встряхните на вортексе в течение 5 секунд.
15. Перенесите примерно 675 мкл супернатанта на колонку с фильтром и открутите 1 минуту на 10 000 g. Слейте жидкость, добавьте следующую порцию супернатанта и открутите 1 минуту на 10 000 g. Повторяйте, пока весь супернатант не пройдет через фильтр. **Примечание:** для каждого образца требуется в сумме три крутки.
16. Добавьте 500 мкл **раствора C5** и открутите на 10 000 g в течение 30 с.
17. Слейте образовавшуюся жидкость.
18. Снова открутите пробирки 1 минуту на 10 000 g.
19. Осторожно перенесите колонку с фильтром в чистую микроцентрифужную пробирку (входит в набор). Проследите, чтобы **раствор C5** не попал на колонку.
20. Добавьте 100 мкл **раствора C6 без ЭДТА** (либо стерильную воду для ПЦР) в центр белой мембраны фильтра.
21. Открутите на 10 000 g в течение 30 с.
22. Колонка утилизируется, а в пробирке находится ДНК, пригодная для дальнейших экспериментов. Дополнительная обработка или очистка не требуется. Выделенную ДНК хранить при -20º.

Необходимое оборудование:

1) микроцентрифуга (до 10 000 g); 2) дозатор (50-500 мкл); 3) вортекс; 4) резиновые перчатки.

1.2. **Выделение ДНК из бактериальной биомассы с помощью Wizard Genomic DNA Purification Kit**

Примечание: все операции производить в резиновых перчатках

1. Отцентрифугируйте 1 мл культуральной жидкости в течение 2 минут при 13000-16000xg*с целью осаждения клеток**.**
2. Удалите супернатант. При работе с гр+ бактериями переходите к пункту 3, при работе с отрицательными – к пункту 6.
3. Ресуспензируйте клетки в 480 мкл 50mM EDTA (pH8).
4. Добавьте 120 мкл Cell Lysis Solution - литического раствора белка лизоцима (10mg/ml) с целью разрушения клеточной стенки бактерий и последующего лизиса клеток.
5. Для некоторых видов *Staphylococcus sp*. Смешивают 60 мкл лизоцима и 60 мкл лизостафина для более эффективного результата, однако большинство клеток грамм-положительных бактерий (таких как *Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, Nocardia sp, Rodococcus rhodochrous*) лизируются одним лизоцимом.
6. Инкубируйте образцы при 37°C в течение 30-60 минут. Отцентрифугируйте 1 мл культуральной жидкости в течение 2 минут при 13000-16000xg и удалите супернатант**.**
7. Добавьте 600 мкл Nuclei Lysis Solution. Ресуспензируйте клетки.
8. Инкубируйте при 80°C в течение 5 минут, а затем остудите при комнатной температуре.
9. Добавьте 3 мкл RNase Solution, перемешать.
10. Инкубировать 15-60 мин. при 37°C. Остудить образцы при комнатной температуре.
11. Добавьте 200 мкл Protein Precipitation Solution к лизату клеток. Вортекс на высокой скорости 20 секунд.
12. Инкубируйте образцы на льду (при 0°C) 5 мин.
13. Отцентрифугируйте при 13000-16000xg 3 мин.
14. Перенесите супернатант, содержащий ДНК, в чистую микроцентрифужную пробирку с 600 мкл изопропанола комнатной температуры. Перемешайте до однородной массы.
15. Отцентрифугируйте в течение 2 минут при 13000-16000xg
16. Добавьте 600 мкл 70% этанола комнатной температуры. Перемешайте.
17. Отцентрифугируйте в течение 2 минут при 13000-16000xg
18. Удалите этанол и подсушивайте на воздухе в течение 10-15 минут.
19. Добавьте 100 мкл ДНК Rehydration Solution и инкубируйте при 65°C 1 час, периодически помешивая, либо 12 часов при комнатной температуре или при 4°C.
20. Выделенные образцы ДНК хранятся при температуре -20°C.

* — максимальная скорость работы микроцентрифуги.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ КЛЕТОК ПРОКАРИОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПРЕДЕЛЕННЫХ БУФЕРОВ

Состав буферных растворов, используемых при выделении ДНК

БУФЕР 1

На 50мл:

ЕДТА pH 8.0 10мМ (1мл 0.5М ЭДТА)
TrisHCl pH 8.0 25мМ (2.5мл 0.5М TrisHCl) } ⇨ до 50 мл стер. дистил H2O

БУФЕР 2 (лизис буфер)

SDS 3%

БУФЕР 3 (протонирование ДНК)

Ацетат калия 5М pH 5.0-5.5

wash-solution (на 100 ml раствора)**:**

2 ml 5M NaCl
1 ml 10 mM Tris
0.5 ml 0.5 M ЭДТА
48 ml этанола (96%)
48.5 ml water MQ

Соотношение объемов буферов при выделении ДНК должно быть одинаково

1. Ресуспендировать 50 мкл биомассы в 100 мкл буфера **I**
2. Добавить к полученной суспензии 150 мкл буфера **II.** Все перемешать.
3. Добавить 120 мкл р-ра лизоцима (10 мг в 1 мл р-ра (v:v; 1:1) 0.05М ЭДТА и 0.1М TrisHCl)
4. Инкубировать суспензию 10-20 мин при 68°С или 72°С
5. Добавить к суспензии 150 мкл буфера **III**, перемешать и встряхивать 2-3 мин на вортексе (лучше перемешивать пипеткой).
6. Центрифугировать суспензию 7 мин при 14 тыс. об/мин
7. Осторожно отобрать супернатант.

Стадии очистки ДНК:

8. Добавить к отобранному супернатанту 0,2 мл смолы Wizard-prep “Promega”, тщательно перемешать (15-20 раз пипеткой) и нанести смесь на колонку, предварительно вставленную в эпендорф.
9. Центрифугировать последовательно все содержимое в режиме 30с. 1тыс.об./мин.
10. Промыть смесь в колонке 2 мл wash-solution. Нанесение р-р ДНК со смолой на колонку, вставить колонку в эпендорф продавить смесь шприцом через колонку, отсоединить шприц от колонки не отпуская поршня (чтобы ДНК не выплеснулась обратно). Вытащить поршень и внести в шприц 2мл wash-solution, продавить.
11. Центрифугировать при 13 тыс. об/мин 3 мин.
12. Поместить колонку в чистый эпендорф. Осторожно нанести 50 мкл MQ воду в центр колонки (не касаясь стенок) и прогреть 5 мин при температуре от 30 до 65С.
13. Центрифугировать при 12 тыс об/мин 40 сек.
14. Удалить колонку из эпендорфа. Фуговать еще раз при 12 тыс об/мин 1 мин и не касаясь стенок перенести растворенную в MQ ДНК в чистый эпендорф (очистка от возможного присутствия смолы – она остается на стенках). Хранить эллюированную ДНК при - 20°С.

Глава 2. Амплификация фрагментов генетического материала

Поскольку извлеченного материала, как правило, недостаточно для непосредственной идентификации, следующим этапом исследования всегда является амплификация фрагментов полученного генетического материала с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) с соответствующим образом подобранными праймерами и условиями реакции. Целью амплификации является наработка материала в количестве, достаточном для последующих экспериментов по идентификации штаммов микроорганизмов, источников этого материала. Продукты амплификации далее используются для анализа либо путем прямого секвенирования, либо с помощью электрофореза в градиенте денатурирующего агента (DGGE), или для гибридизации in situ (FISH). В настоящее время одними из самых распространенных методов в исследованиях биоразнообразия микробных сообществ являются методы, основанные на анализе первичных последовательностей нуклеиновых кислот. В сочетании с ПЦР-анализом, они позволяют наиболее точно проводить идентификацию микроорганизмов и оценку степени родства между ними. Первые попытки исследований микробных сообществ с помощью подхода на основе определения нуклеотидных последовательностей генов рРНК приходятся на 1985 год. Именно в это время появились работы по анализу разнообразия сообществ микроорганизмов с помощью секвенирования генов 5S рРНК. Эти пионерные исследования привели к интересным результатам, однако, вследствие небольшой информативности молекулы 5S рРНК, а также невозможности анализа сложных сообществ с помощью данного подхода, последующее использование 5S рРНК не получило широкого распространения. Позднее, для исследований в области микробной экологии, был предложен подход на основе использования более крупных молекул: 16S рРНК (1500 нуклеотидов) (*Woese, 1987*) и 23S рРНК (3000 нуклеотидов). Анализ полной или частичной длины молекулы 16S рРНК, обладающей достаточной

информацией для надежных филогенетических исследований, получил наиболее широкое распространение в изучении микробных сообществ (*Amann et al., 1995*). Гены рРНК являются наиболее подходящими для идентификации микроорганизмов в силу ряда особенностей: они универсальны для всех прокариот, состоят как из консервативных, так и вариабельных участков, скорее всего не участвуют в горизонтальном переносе, выполняют важные функции, находятся в достаточном количестве в клетке и несложно из нее выделяются. Длина генов 16S рРНК не слишком велика и в то же время достаточна для обеспечения статистически достоверной точности анализа, к тому же нуклеотидные последовательности молекулы 16S рРНК широко представлены в постоянно пополняющейся базе данных (*Prosser, 2002; Kirk et al., 2004*). На основе анализа генов 16S рРНК группой ученых под руководством Вёзе (*Woese, 1987*) была предложена схема эволюции, согласно которой все прокариоты разделяются на два домена: Bacteria и Archaea. В настоящее время количество основных филумов бактерий с 12, описанных у Вёзе для культивируемых представителей, расширилось до 56 с учетом групп, не содержащих культивируемые формы (*Нетрусов и др., 2006*). Среди архей, помимо двух выделенных ранее Вёзе филумов, недавно была выделена еще одна филогенетическая группа – Korarchaeota, представленная исключительно некультивируемыми организмами (*Нетрусов и др., 2004*).

2.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) (Polymerase chain reaction (PCR)) — метод, который перевернул современную молекулярную биологию, экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

В начале 1970-х гг. норвежскому ученому Хьеллю Клеппе из лаборатории нобелевского лауреата Хара Гобинды Хораны пришла в голову мысль, что можно амплифицировать ДНК с помощью пары коротких

одноцепочечных молекул ДНК – синтетических праймеров. Однако в то время эта идея осталась невостребованной. Полимеразная цепная реакция была вновь открыта в 1983 г. Кэри Мюллисом *(http://elementy.ru/lib/430350; http://www.pcr.ru/bibliogr/how_pcr/how_pcr.htm)*. “Этот удивительно простой метод получения фрагментов ДНК в неограниченном количестве копий был придуман при необычных обстоятельствах - ночью, во время автомобильной поездки в горах Калифорнии” (*Телков М.В., 2006*). Его целью было создание метода, который бы позволил амплифицировать ДНК в ходе многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы.

Через 7 лет после опубликования этой идеи, в 1993г., Мюллис получил за проведение реакции амплификации Нобелевскую премию в области химии. Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах, (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований (3 kbp) (*Ребриков Д.В. и др., 2009*). С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20-40 тысяч пар нуклеотидов. Это всё равно значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки. Геном человека, например, состоит примерно из 3млрд пар оснований.

ПЦР проводят в амплификаторе (программируемом термостате) — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1°C. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», Touchdown ПЦР (см. ниже) и последующего хранения амплифицированных молекул при 4 С.

2.2. Стадии полимеразной цепной реакции

Денатурация

Первая стадия обеспечивает разделение нитей ДНК. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96°С (или до 98 С, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5—2 мин., чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется *денатурацией*, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Иногда перед первым циклом (до добавления полимеразы) проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 мин. для полной денатурации матрицы и праймеров. Такой приём называется *горячим стартом*, он позволяет снизить количество неспецифичных продуктов реакции.

Отжиг

Гибридизация (отжиг) праймеров на матрице. Проводят при температуре от 45 до 65°С. Гибридизация подразумевает связывание комплементарных цепей нуклеиновых кислот. Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется *отжигом*. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 4—5°С ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5—2 мин. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

Синтез (удлинение) цепи. Проводят при температуре около 72°С.

Происходит синтез комплементарных цепей и удваивает число молекул ДНК мишени. ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия **элонгации**. Полимераза начинает синтез

второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль неё. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 С. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию *финальной элонгации*, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7-10 мин.

Для получения достаточного количества копий искомого характеристического фрагмента ДНК амплификация включает несколько (20-40) циклов.

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты (состав «PCR-коктейля»):

- *ДНК-матрица*, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать (~12µl/100µl смеси).
- *Два праймера*, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК (в концентрации~100pkM/100µl смеси).
- Термостабильная *ДНК-полимераза* — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК (~500ед/100µl смеси). Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре (95°C) длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие (*Dang C, Jayasena S.D, 1996*).
- *Дезоксинуклеозидтрифосфаты* (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) – «кирпичики», необходимые для синтеза новой цепи (~20µM/100µl смеси).
- Ионы Mg^{2+}, необходимые для работы полимеразы.

- *Буферный раствор*, обеспечивающий условия реакции — pH, ионную силу раствора. Tris-HCl, pH = 8,0-8,8; содержит соли, бычий сывороточный альбумин. В случае 10-и кратного буфера (x10) его количество в «PCR-коктейле» не должно превышать 0.1% от всего объема смеси.
- В приготовлении «PCR-коктейля» используется исключительно MQ-water (очищенная от нуклеаз бидистиллированная вода)

2.3. Праймеры

Праймер (primer) — это короткий фрагмент нуклеиновой кислоты, длиной порядка двадцати оснований, который служит стартовой точкой при репликации ДНК. Они гибридизуются с ДНК-мишенью, которая затем копируется полимеразой. Праймеры необходимы ДНК-полимеразам, так как ДНК-полимеразы могут только наращивать существующую цепь. Полимеразы начинают репликацию с 3'-конца праймера, и создают копию другой цепи. В большинстве случаев естественной репликации ДНК, праймером для синтеза ДНК, является короткий фрагмент РНК (создаваемый заново). Такой рибонуклеотидный праймер создается ферментом праймазой, и впоследствии заменяется дезоксирибонуклеотидами полимеразой, выполняющией в норме функции репарации. Многие лабораторные методы в биохимии и молекулярной биологии, которые предполагают использование ДНК-полимеразы, такие, как секвенирование или полимеразная цепная реакция, требуют наличие праймеров. Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка. После гибридизации матрицы с праймером (отжиг), последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы. Важнейшая характеристика праймеров — температура плавления (T_m) комплекса праймер-матрица. T_m это

температура, при которой половина ДНК-матриц образует комплекс с олигонуклеотидным праймером. Верхний предел температуры плавления ограничен оптимумом температуры действия полимеразы, активность которой падает при температурах выше 80 С. При выборе праймеров желательно придерживаться следующих критериев:

- GC-состав ~ 40—60 %;
- близкие температуры плавления (T_m) праймеров (отличия не более, чем на 5 С);
- отсутствие неспецифических вторичных структур — «шпилек» и димеров;
- желательно, чтобы на 3'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.

Если нуклеотидная последовательность матрицы известна частично или неизвестна вовсе, можно использовать *вырожденные праймеры*, последовательность которых содержит вырожденные позиции, в которых могут располагаться любые основания. Например, последовательность праймера может быть такой: …*ATH*…, где *H — A, T* или *C*.

Основные принципы ПЦР

1. Амплификация фрагмента происходит между двумя праймерами
2. Амплификацию проводят в течение 30-40 циклов
3. Каждый цикл состоит из смены температурных режимов
4. В реакции используют термостабильные ДНК-полимеразы
5. За 30 циклов происходит умножение амплифицируемого фрагмента ДНК в 1 000 000 000 раз
6. Кинетика ПЦР характеризуется выходом на «плато»

2.4. Разновидности ПЦР

- «Вложенная» ПЦР (Nested PCR) — применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и

проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

- «Инвертированная» ПЦР (Inverse PCR) — используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод особенно полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для осуществления инвертированной ПЦР проводят ряд разрезаний ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов (лигирование). В результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка, после чего можно проводить ПЦР как обычно.
- ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) — используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из библиотеки РНК. Перед обычной ПЦР проводят на матрице мРНК синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одноцепочечную кДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР. Этим методом часто определяют, где и когда экспрессируются данные гены.
- Асимметричная ПЦР (*Asymmetric PCR*) — проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке.
- Количественная ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR) — используется для быстрого измерения количества определенной ДНК, кДНК или РНК в пробе.
- Количественная ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time PCR) — в этом методе используют флуоресцентно меченые реагенты для точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления. Применение системы детекции результатов ПЦР в режиме «реального

времени», наряду с ответом на вопрос о наличии или отсутствии в исследуемом образце мишени, позволяет оценить его количество (*Higuchi, et al, 1993*).

- Touchdown (Stepdown) ПЦР (Touchdown PCR)— с помощью этого метода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров на образование продукта. Первые циклы проводят при температуре выше температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру снижают. При определённой температуре система пройдёт через полосу оптимальной специфичности праймеров к ДНК.
- Метод молекулярных колоний (ПЦР в геле, *Polony - PCR Colony*) — акриламидный гель полимеризуют со всеми компонентами ПЦР на поверхности и проводят ПЦР. В точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.
- ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (*Rapid amplification of cDNA ends, RACE-PCR*)
- ПЦР длинных фрагментов (*Long-range PCR*) — модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч оснований и больше). Используют две полимеразы, одна из которых — Taq-полимераза с высокой процессивностью (то есть, способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая — ДНК полимераза с 3'-5' эндонуклеазной активностью. Вторая полимераза необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесенные первой.
- RAPD PCR (*Random Amplification of Polymorphic DNA PCR*, ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК — используется тогда, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы, например, разные сорта культурных растений, породы собак или близкородственные микроорганизмы. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (20 — 25 п.н.). Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам ДНК

исследуемых организмов. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру и пр.), удается добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов.

- RISA представляет собой анализ полиморфизма длин участков между генами 16S и 23S рРНК. Амплификация этих участков, размеры которых варьируют от 50 п.н. до более чем 1500 п.н. в зависимости от вида (*Ranjard et al., 2000*), приводит к получению фрагментов, которые затем разделяются в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (*Kirk et al., 2004*).

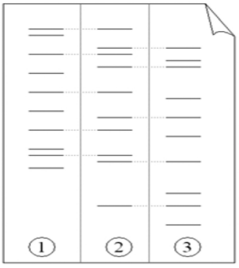
2.5. Факторы, влияющие на точность молекулярных исследований

Молекулярно-биологические методы, несомненно, открывают новые возможности в исследовании микробных сообществ, позволяя избежать проблем, связанных с культивированием микроорганизмов. Тем не менее, эти методы, в свою очередь, также имеют ряд ограничений. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) играет важную роль в молекулярно-биологических исследованиях, однако наряду со своими преимуществами перед методами, основанными на культивировании, также имеет некоторые ограничения (*Qui et al., 2001*). Из-за разницы во вторичных структурах молекул ДНК, а также вследствие различной степени сродства праймеров к образцам (*Kirk et al., 2004*), в ходе реакции может происходить преимущественная амплификация генов одних микроорганизмов по отношению к другим. Есть указания, что амплификация матрицы ДНК с большим содержанием гуанина и цитозина идет медленнее из-за менее эффективного разделения цепей во время стадии денатурации при ПЦР (*Theron and Cloete, 2000*). Часто бывает затруднена амплификация генов рибосомальной РНК экстремально термофильных архей по сравнению с бактериями (*Reysenbach et al., 1992*). Кроме того, минорные компоненты сообщества могут быть вовсе утеряны в ходе амплификации суммарной ДНК (*Amann et al., 1995*). Все это, наряду с возможным образованием химер в ходе ПЦР (*Theron and Cloete, 2000*), а также ошибками

полимеразы (*Qiu et al., 2001*), может приводить к искажению конечных результатов и затруднениям в их интерпретации (*Theron and Cloete, 2000*).

Некоторые авторы к ограничениям ПЦР относят также ее высокую чувствительность, как к веществам – ингибиторам реакции (*Stackebrandt et al., 1999*), так и к загрязнениям, приводящим к ложноположительным или ложноотрицательным результатам (*Theron and Cloete, 2000*). Принцип метода **полимеразной цепной реакции (ПЦР)** в настоящее время широко используется как для научных исследований, так и для диагностики в практическом здравоохранении и службе госсанэпиднадзора (генотипирование, диагностика инфекционных заболеваний).

Криминалистика. ПЦР используют для сравнения так называемых «генетических отпечатков пальцев». Необходим образец генетического материала с места преступления — кровь, слюна, волосы и т.п. Его сравнивают с генетическим материалом подозреваемого. Достаточно совсем малого количества ДНК, теоретически — одной копии. ДНК расщепляют на фрагменты, затем амплифицируют с помощью ПЦР. Фрагменты разделяют с помощью ДНК электрофореза. Полученную картину расположения полос ДНК и называют *генетическим отпечатком пальцев.*



Кроме того ПЦР может использоваться при установлении отцовства (рис.1). Результаты электрофореза ДНК-фрагментов, амплифицированных с помощью ПЦР. Ребенок унаследовал некоторые особенности генетического аппарата обоих родителей, что дало новый, уникальный отпечаток.

Рис. 1 (1) Отец. (2) Ребенок. (3) Мать.

Медицинская диагностика

ПЦР дает возможность существенно ускорить и облегчить диагностику наследственных и вирусных заболеваний. Нужный ген амплифицируют с

помощью ПЦР с использованием соответствующих праймеров, а затем секвенируют для определения мутаций. Вирусные инфекции можно обнаруживать сразу после заражения, за недели или месяцы до того, как проявятся симптомы заболевания.

Персонализированная медицина

Известно, что большинство лекарств действуют не на всех пациентов, для которых они предназначены, а лишь на 30-70 % их числа. Кроме того, многие лекарства оказываются токсичными или аллергенными для части пациентов. Причины этого — отчасти в индивидуальных различиях в восприимчивости и метаболизме лекарств и их производных. Эти различия детерминируются на генетическом уровне. Например, у одного пациента определенный цитохром (белок печени, отвечающий за метаболизм чужеродных веществ) может быть более активен, у другого — менее. Для того, чтобы определить, какой разновидностью цитохрома обладает данный пациент, предложено проводить ПЦР-анализ перед применением лекарства. Такой анализ называют предварительным генотипированием.

Другой метод амплификации

Лигазная цепная реакция (ЛЦР, LCR) - метод амплификации, включающий последовательные циклы лигирования (соединения) четырех олигонуклеотидных зондов, комплементарных цепям ДНК-матрицы. Метод впервые описан в 1989 году. В нем используется способность ДНК-лигазы соединять две пары комплементарных олигонуклеотидов после их гибридизации с последовательностями мишени in vitro. Основными компонентами ЛЦР являются: лигаза, два или четыре специфических праймера и буфер для цепной реакции. В ряде случаев набор может содержать и другие вспомогательные компоненты для осуществления лигазной цепной реакции.

2.6. Амплификация фрагментов гена 16S рРНК

Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК часто используется универсальная праймерная система (*Edwards U., 1989*)

Универсальные праймеры:

341F-GCd 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'

907Re 5'-CCGTCAATTCMTTTGAGTTT- 3'

Состав реакционной смеси для ПЦР в объеме 25 мкл:

- Праймеры – по 25 пмоль каждого;
- 10X буфер полимеразы BioTaq (2 мМ $MgCl_2$; 17 мМ $(NH_4)_2S0_4$; 6 мМ Трис-HC1, pH 8.8) – 2,5 мкл (0,1 часть от всего объема);
- 10 мМ dNTP – 0,5 мкл (по 1 нМ каждого из четырех дезокситрифосфатов);
- BioTaq полимераза (5Е/мкл) – 0,12 мкл;
- ДНК-матрица – 50 нг (~3µl/25µl смеси);
- H_2O – до 25 мкл.

После приготовления смесь рекомендуется перемешать на вортексе.

С приведенным выше составом смеси реакцию проводят по следующей схеме:

Первый цикл: 94°C – 5 мин;

Последующие 20 циклов: 94°C – 1 мин, 65°C – 1 мин… 55°C – 1 мин (понижение температуры отжига праймеров с каждым циклом на 0,5^{o}C), и 72°C – 3 мин;

Последние 15 циклов: 94°C – 1 мин, 55°C – 1 мин и 72°C – 3 мин.

После окончания последнего цикла, смеси дополнительно выдерживают 7 мин при 72°C для достройки незавершенных цепей.

С целью получения полноразмерного гена 16S применяют пару «полнометражных» праймеров:

11F 5`-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3`

1492R 5`-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3`,

где M = C или A, Y = C или T.

Используют следующий температурно-временной профиль. Первый цикл: 94°C, 9 мин, 55°C, 1 мин и 72°C, 2 мин; последующие 35 циклов: 94°C, 1 мин, 55°C, 1 мин и 72°C, 2 мин, окончательная полимеризация - 7 мин при 72°C.

В настоящее время определение последовательностей генов 16S рРНК стало обязательным этапом в идентификации прокариот (*Нетрусов и др., 2004*). С появлением методов, основанных на секвенировании генов 16S рРНК, представление об экологии микроорганизмов изменилось кардинальным образом. Однако следует отметить, что данный подход не позволяет проводить оценку разнообразия микроорганизмов, выполняющих определенную экологическую функцию в экосистеме, не позволяет получать полную информацию о микробном сообществе, оставляя в тени вопросы, связанные с филогенией, экологией и разнообразием определенных функциональных групп микроорганизмов, ответственных за азотфиксацию, нитрификацию, денитрификацию, окисление метана и т.д. Для изучения функциональных особенностей естественных микробных сообществ широкое распространение получил подход на основе анализа функциональных генов (*Prosser, 2002*). В качестве молекулярных маркеров используются гены (или их фрагменты), кодирующие: нитрогеназу (*Задорина и др., 2009*; *Булыгина и др., 2002; Кравченко и др., 2003; Omoregie et al., 2004; Reiter et al.,2003*) нитритредуктазу (*Throback et al., 2007*), нитратредуктазу (*Gregory et al., 2000*), монооксигеназу аммиака (*Rotthauwe et al., 1997*), метанмонооксигеназу (*Dedysh S.N. et al., 2007; Holmes et al., 1995*), метанолдегидрогеназу (*McDonald and Murrell, 1997*), рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилазу/оксигеназу (*Tolli and King, 2005*) и другие белки.

2.7. Методы определения наличия хитиназного гена группы А у чистых культур микроорганизмов и в почве (ПЦР со специфичными праймерами)

Часто в работах по оценке разнообразия микробных сообществ исследователи прибегают к использованию различных модификаций ПЦР, позволяющих повысить чувствительность метода. Так, с помощью nested-PCR становится возможным выявление специфических компонентов сообщества, часто не обнаруживаемых при обычной ПЦР (*Burgmann et al., 2004*). При этом сначала проводится амплификация целевых фрагментов с использованием универсальных праймеров, а затем реамплификация продукта с помощью видо- или группоспецифичных праймерных систем. В частности, можно использовать праймеры для конкретных микроорганизмов, на чем основана современная медицинская диагностика.

Так, например, наличие хитиназного гена группы А в образцах возможно оценить в соответствии с методикой Nested PCR (*Williams, 2000*) в 2 этапа. На 1 этапе используются праймеры GA1F и GA1R, на 2 этапе GASQF и GASQR. (см. таблицу 1) Реакцию проводят по следующей схеме: 1 цикл: 94°C – 5 мин; 35 циклов: 94°C – 1 мин 60°C – 10 сек, 72°C – 1 мин; 1 цикл: 72°C – 10 мин.

Система используемых праймеров:

Праймер[a]	Последовательность (5'→3')
GA1F	cgtcgacatcgactgggartdbcc
GA1R	acgccggtccagccnckncctra
GASQF	*cgtcgacatcgactggga
GASQR	acgccggtccagcc

Таблица 1. Список использованных праймеров

[a] - F, forward primer, R, reverse primer; прямой и обратный праймеры
*GC «хвост», присоединенный, к 5' концу праймера (cgcccggggcgcgccccgggcggggcgggggcacgggggg).

Замены букв **R**, A or g, **Y**, C or T, **S**, C or g, **B**, C or g or T, **N,** A or C or g or T, **K**, G or T, **D**, A or g or T.

Глава 3. Анализ продуктов амплификации

Анализ продуктов амплификации проводят при помощи электрофореза - ПЦР-фрагменты подвергают разделению в агарозном или в полиакриламидном геле в условиях градиента денатурирующих агентов (DGGE) в зависимости от задачи эксперимента.

3.1. Электрофорез – это перемещение заряженных частиц в растворе (в зависимости от знака их суммарного электрического заряда) к аноду или катоду под действием электрического поля. Поскольку скорость движения молекул в электрическом поле зависит от их заряда, формы и размера, то электрофорез может быть использован для их разделения.

Электрофорез позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд, причем эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности.

Биологические макромолекулы – белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и др. – находятся в водном растворе в виде частиц, несущих определённый электрический заряд. Заряд макромолекулы определяется входящими в ее состав группами, способными к электролитической диссоциации. Степень диссоциации групп зависит от многих факторов, в частности, от pH среды. Общий заряд биологической макромолекулы также может изменяться при её взаимодействии с ионами или другими молекулами.

Наиболее широкое применение электрофорез получил для анализа и очистки белков и нуклеиновых кислот, хотя этот метод может быть использован и для других заряженных биологических молекул, таких как сахара, аминокислоты, пептиды, нуклеотиды и др. Для фракционирования белков, нуклеиновых кислот и их фрагментов в настоящее время используют почти исключительно гель-электрофорез. Наиболее широко используются

полиакриламидные (ПААГ) гели и гели агарозы. Варьируя концентрацию полимера, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор.

Если амплифицированные ПЦР-фрагменты поместить в гель и приложить постоянное электрическое поле, то они будут двигаться по направлению к аноду, причем молекулы меньшей длины будут передвигаться быстрее, тогда как более тяжелые будут оседать ближе к катоду (рис. 2). Не следует забывать, что на результаты ПЦР сильно влияют температура отжига и концентрации ионов магния (Рис. 3а,б).

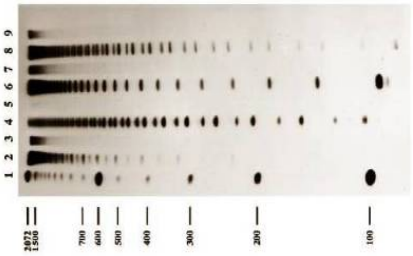


Рис. 2 Результаты электрофореза ДНК-фрагментов, амплифицированных с помощью ПЦР.

а) б)

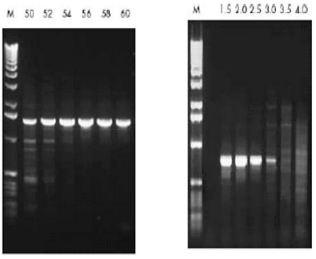


Рис. 3 Результаты электрофореза ДНК-фрагментов, амплифицированных с помощью ПЦР при различных условиях температур отжига (а) и концентрации ионов магния (б).

3.1.1. Приготовление агарозного геля:

Примечание : Работать только в одноразовых перчатках!

1. Приготовить 1.2% раствор агарозы (0.9 г агарозы + 75 мл буфера 0.5xTAE (буфер, содержащий Трис, ацетат и ЭДТА)). Можно использовать 1% агарозный гель в однократном TAE-буфере.

С целью окрашивания добавить (ОСТОРОЖНО!) к 75 мл р-ра агарозы 32 мкл бромистого этидия (0.5 мг/мл). Внимание! Работа с бромистым этидием производится под тягой!

2. Поставить гребенки и дать застыть гелю.
3. В каждую ячейку геля поместить по 1µl красителя и 3-5µl матрицы.
4. Залить в электрофорез 0.5хТАЕ буфер и поместить в него гель.

Агарозный электрофорез проводят в условиях при напряженности поля 6 В/см. в течении 40 мин.

3.1.2. Приготовление полиакриамидного геля:

Подготовка стекол

1. Вымыть с моющим средством стекла для геля и высушить их (или вытереть насухо)
2. Сполоснуть MQ водой и вытереть бумажной салфеткой
3. Обработать 70% этанолом и вытереть бумажной салфеткой
4. Сполоснуть MQ и вытереть стекла так чтобы не оставалось ворсинок
5. Вставить между стеклами прокладки
6. Закрепить их между зажимами (маленькое стекло ближе к вам)
7. Заклеить дно бумажным скотчем
8. Отрегулировать расстояние между прокладками с помощью картонки (картонка должна без усилия вставляться и выниматься). Перед регулировкой картонку необходимо обработать 70% раствором этанола.
9. Установить конструкцию со стеклами в стойку и закрепить ее
10. Проверить уровень и если нужно отрегулировать его

Гели

<u>Для 6% полиакриламидного геля:</u>

0% денатуранта:

15мл полиакриламида (BioRad 37.5%:1 **40%**)
2мл 50хТАЕ

до 100 мл водой (MQ)

80% денатуранта:

33,6 г мочевины
2мл 50хТАЕ
32 мл формамида
15мл полиакриламида(BioRad 37.5%:1 **40%**)

до 100 мл водой (MQ)

Все растворы фильтровать через фильтр!
В **<u>8% гель</u>** вносят 20мл полиакриламида(BioRad 37.5%:**1 40%**)

Гель для изоляции (чтобы не подтекало между стеклами)

0% денатурирующий раствор (4°C)	2 мл
10% раствор персульфата аммония APS(4°C)	20 мкл
TEMED (4°C)	2 мкл

Все быстро перемешать и нанести по 1 мл с каждой стороны пластины, так чтобы смочить прокладки. Стекла закрываются фольгой и подождать 1 час

Градиентный гель

Объем растворов: 10мл 20% (2,5мл 80% р-ра и 7,5мл 0% р-ра)
10мл 80% р-ра
5мл 0% р-ра

Перед заливкой геля растворы ставятся на лед. Внесение APS и ТЕМЕД необходимо проводить при температуре 4^0С.

На **10мл** растворов вносят **50мкл APS и 6.7мкл ТЕМЕД** (или 100APS и 10 ТЕМЕД, но когда гели будут готовы, обязателен предварительный форез при 100V 1 час, лунки промываются MQ)
На **5мл** растворов вносят **25мкл APS** и **5мкл ТЕМЕД**

Заливка градиентного геля

1. Два геля готовят одновременно (20-ти и 80%-ный по 10мл). Внести в пробирки р-ры содержащие акриламид, а затем остальные растворы.
2. Медленно (не допуская газирования) все перемешать. Наполнить данными растворами шприцы, выгнать пузыри и закрепить в штативы для приготовления градиентного геля. Шприц с гелем, в котором содержание акриламида (%) больше занимает дальнее положение.
3. Соединить трубочки и вставить иглу между стеклами.
4. Залить гель между стеклами, вращая колесо по часовой стрелки с равной скоростью. Вставить гребенку. Приготовить гель с 0-вым % денатуранта (5мл) и пипеткой долить до края стекол. Закрыть стекла фольгой и подождать 2 часа
5. Снять бумажный скотч со дна.
6. Вытащить гребенку, промыть лунки MQ или буфером! (можно уже в камере).

Подготовка гелей для гель-электрофореза
(если использовали высокие концентрации APS и ТЕМЕД)

1. Промыть ячейки MQ водой. Установить стекла с гелем в держатель и всю конструкцию поместить в камеру с буфером (60ºС).
2. Закрыть крышку камеры. Затем включить питание камеры, включить подогрев “Heat” и насос. Подождать пока буфер заполнит верхнюю камеру. Затем включить источник питания и установить напряжение 70 V и запуск. Подождать 1 час
3. Выключить источник питания, насос нагревание и питание камеры. Прежде чем открыть крышку камеры необходимо подождать 10-20 сек.
4. Вытащить штатив с пластинами. Слить буфер из верхней камеры
5. Включить питание камеры, нагрев и насос. Подождать пока буфер заполнит верхнюю камеру
6. Включить источник питания, выставить необходимое напряжение и запуск. ДГГЕ идет 16 часов.

Для документации результатов электрофореза могут быть использованы различные гель-документирующие системы.

Глава 4. Оценка мониторинга микробных сообществ методами, основанными на использовании ПЦР

Методы, основанные на использовании ПЦР с целью мониторинга микробных сообществ, позволяют избежать трудоемких и дорогостоящих процедур клонирования и определения последовательностей амплифицированных фрагментов нуклеиновых кислот. С помощью них возможно проведение оценки изменений в структуре микробных сообществ, связанных с временной и пространственной динамикой. Существует два принципиальных подхода: 1) Получение целевых продуктов с последующим их анализом на основе градиентного гель-электрофореза (методы DGGE, TGGE) или рестриктазной обработки (ARDRA, T-RFLP); 2) Использование ДНК-фингерпринтинга на основе случайных праймеров или праймеров, комплементарных к повторяющимся структурам генома (RISA, RAPD).

I подход

Анализ с помощью градиентного гель-электрофореза

Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE) и температурный градиентный гель-электрофорез (TGGE) являются двумя сходными методами изучения микробного разнообразия. Первоначально они были развиты для детекции точечных мутаций в последовательностях ДНК (*Kirk et al., 2004*). Мюйзер с соавторами (*Muyzer et al., 1993*) расширили использование DGGE, применив его для исследования микробных сообществ. DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis) - метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза - основан на зависимости свойств плавления (или денатурации) небольших двухнитевых молекул ДНК от их нуклеотидной последовательности, а точнее - от соотношения A-T- и G-C-пар в исследуемых

фрагментах. Объясняется это тем, что G-C-связь более прочна по сравнению со связью между нуклеотидами A и T. Подобные различия в динамике плавления могут быть выявлены путем сравнения подвижности нормальных и мутантных двухнитевых фрагментов ДНК при их электрофорезе в денатурирующих условиях. Градиент денатурации достигается разницей температур, различной концентрацией мочевины или формальдегида в гелях. При этих условиях одинаковые по величине двухнитевые молекулы ДНК, отличающиеся по нуклеотидной последовательности, денатурируют по-разному. Все это позволяет разделять одинаковые по длине, но различающиеся по нуклеотидному составу, фрагменты под действием градиента химических денатурантов в полиакриламидном геле – формамида и мочевины – в DGGE, или под воздействием градиента температуры в TGGE. С увеличением степени плавления происходит снижение подвижности фрагментов, однако при полном их расплавлении, она резко возрастает. Для того чтобы это предотвратить выделенную из образца почвы ДНК подвергают амплификации с использованием праймеров, один из которых содержит на своем 5'-конце так называемый Г-Ц "зажим"("clamp"), состоящий примерно из 40 остатков гуанина и цитозина. С помощью методов DGGE/TGGE теоретически возможно разделение ПЦР-фрагментов, отличающихся лишь на одну пару оснований. Это достаточно быстрый, воспроизводимый и эффективный метод оценки изменений в структуре небольших микробных сообществ (*Kirk et al., 2004*). Он с успехом был применен в исследованиях ризосферных микробных сообществ (*Duineveld et al., 2001; Marschner et al., 2004*), сообществ водных экосистем (*Diez et al., 2001*), а также все большее внимание приобретает в работах по оценке влияния антропогенного фактора на микрофлору почв (*Ibekwe et al., 2001*), включая экологические исследования по оценке риска биотехнологических растений (*Jung et al., 2008*).

Анализ на основе рестриктазной обработки ПЦР-фрагментов

Метод анализа полиморфизма длины фрагментов рестрикции (RFLP), также еще известный как анализ рестрикции амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA), представляет собой один из инструментов исследования микробного разнообразия. Выделенная из природного образца ДНК подвергается амплификации с последующим расщеплением ПЦР-фрагментов рестриктазами. Различие в длине фрагментов детектируется с помощью электрофореза в агарозном или полиакриламидном (не денатурирующем) геле в случае анализа сообщества. RFLP-профили могут быть использованы для скрининга клонов или для оценки структуры бактериального сообщества. Некоторые ограничения метода RFLP могут быть устранены при использовании анализа полиморфизма длин терминальных фрагментов рестрикции (T-RFLP). Принцип этого метода такой же, как и в RFLP с отличием в том, что один из праймеров мечен флуоресцентным красителем. Таким образом, детектируются только меченные терминальные фрагменты рестрикции. При этом упрощаются профили рестрикции, что позволяет проводить анализ сложных микробных сообществ (*Kirk et al., 2004*).

Данные методы применяются в исследованиях самой различной направленности (*Kirk et al., 2004*), включая работы по оценке влияния биотехнологических растений на структуру микробных сообществ почв (*Lukow et al., 2000; Sessitsch et al., 2003; Ikeda et al., 2006*).

II подход

Методы RISA, RAPD и DAF

RISA представляет собой анализ полиморфизма длин участков между генами 16S и 23S рРНК. Амплификация этих участков, размеры которых варьируют от 50 п.н. до более чем 1500 п.н. в зависимости от вида (*Ranjard*

et al., 2000), приводит к получению фрагментов, которые затем разделяются в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (*Kirk et al., 2004*). Высокая вариабельность размеров межгенных участков позволяет обнаруживать небольшие изменения в генетической структуре сообщества, а высокая вариабельность их последовательностей позволяет проводить идентификацию разделенных в ходе электрофореза полос. Однако банк данных по последовательностям межгенных участков является не достаточно большим для эффективного проведения идентификации (*Ranjard et al., 2000*). В настоящее время существует автоматическая версия RISA (ARISA), основанная на проведении ПЦР с использованием флуоресцентно-меченного прямого праймера (*Lynch et al., 2004*). Это более чувствительный метод и более быстрый по сравнению с RISA, однако, как и все методы, основанные на ПЦР, ограничен связанными с этой реакцией недостатками (*Kirk et al., 2004*). Кроме того, в случае сложных микробных сообществ, этот метод ограничен в разрешении большого числа различных ПЦР-фрагментов (*Lynch et al., 2004*).

Для оценки изменений в структуре микробных сообществ используются также методы RAPD (случайно амплифицированная полиморфная ДНК) и DAF (фингерпринтинг на основе амплификации ДНК). Оба метода используют набор коротких случайных праймеров (длиной 5-10 нуклеотидов), которые связываются с различными сайтами геномной ДНК, образуя ПЦР-продукты разной длины. Продукты разделяются в агарозном или акриламидном гелях и визуализируются с помощью бромистого этидия или окрашивания серебром. Основной проблемой этих методов является – плохая воспроизводимость. Различия в качестве и количестве ДНК-матрицы, а также в концентрации $MgCl_2$ и праймеров может привести к появлению различных профилей. Кроме того, с помощью этих профилей нельзя получить никакой филогенетической информации (*Muyzer, 1999*).

Глава 5. Клонирование

Под процессом клонирования понимают как создание генетически идентичной копии существующего или существовавшего ранее живого организма путем бесполого размножения, так и просто «встраивание» чужого гена в ДНК изучаемого организма.

При клонировании гена в клетки выделяют следующие этапы:

- Получение изолированного гена.
- Введение гена в вектор для переноса в организм (лигирование с вектором). Лигирование – процесс соединения двух молекул ДНК с образованием новой химической связи, идет 2 часа при комнатной температуре. Состав реакционной среды для лигирования: Буфер TAE, ПЦР фрагмент, Вектор PGEM-T, T4 Лигаза.
- Перенос вектора с геном в модифицируемый организм. Соединение лигата с компетентными клетками *E. Coli* (икубирование при 4^0C)
- Преобразование клеток организма. Высев на твердую среду LB и получение клеток с клонированным геном
- Отбор генетически модифицированных организмов (ГМО) и устранение тех, которые не были успешно модифицированы. При необходимости - выделение ДНК из клонов и проверка наличия ДНК на агарозном геле и дальнейшие молекулярно-биологические анализы (секвенирование).

Получение генетически модифицированных организмов (ГМО) связано со «встраиванием» чужого гена в ДНК исследуемого организма (производят транспортировку гена, т.е. трансгенизацию) с целью изменения свойств или параметров последнего, например, устойчивость растений к засухе, заморозкам, пестицидам и др.

В основе клонирования лежит процесс горизонтального (латерального) переноса генов. Горизонтальный перенос впервые был описан в Японии в 1959 году (*Akiba T, et all, 1960*). При горизонтальном переносе новых генов не образуется (как то имеет место при мутациях), однако осуществляется создание разных генных сочетаний. Это важно по той причине, что естественный отбор действует на всю совокупность признаков организма. Для встраивания гена используют вирусы, плазмиды (кольцевые ДНК) и др., способные проникнуть в клетку организма и затем использовать клеточные

ресурсы для создания множества собственных копий или внедриться в клеточный геном (как и «выпрыгнуть» из него). Для успешного установления контакта двух клеток, в клетке-доноре должна присутствовать конъюгативная (половая, трансмиссивная) плазмида. Первой была открыта F-плазмида: эписома (способная встраиваться в бактериальную хромосому), длиной около 100 тыс. пар оснований. Плазмида несёт гены, кодирующие ряд функций. Одна из них — образование половых пилей, отвечающих за приклепление к клетке-реципиенту.

У прокариот горизонтальный перенос генов может осуществляться в результате:

- - конъюгации – (от лат. *conjugatio* — соединение, прямой перенос, частичное объединение геномов) — однонаправленный перенос части генетического материала (плазмид, бактериальной хромосомы) при непосредственном контакте двух бактериальных клеток. Клетка-донор в ходе непосредственного контакта передаёт клетке-реципиенту часть своего генома (в некоторых случаях весь). Участки ДНК донора могут обмениваться на гомологичные участки ДНК реципиента. Вероятность такого обмена значима только для бактерий одного вида. Имеет большое значение в природе, поскольку способствует обмену полезными признаками при отсутствии истинного полового процесса. Из всех процессов горизонтального переноса генов конъюгация позволяет передавать наибольшее количество генетической информации.
- трансформации – (через окружающую среду) бактериальная клетка может поглощать свободно находящуюся в среде ДНК, включая её в свой геном в случае высокой степени гомологии с собственной ДНК.
- трансдукции – (через фаги или вирусы) в природных условиях протекает обмен генетической информацией при помощи умеренных фагов.

Ниже приведены некоторые данные о горизонтальном переносе генов у прокариот, полученные при полногеномном анализе большого числа видов бактерий и архей (табл 2) (*Koonin, et all. 2001)*.

Таблица. 2
Горизонтальный перенос генов у архей и бактерий

Вид	число генов в геноме	перенесенные гены	
		количество	% в геноме
АРХЕИ			
Archaeoglobus fulgidus	2407	179	8.4
Methanococcus jannaschii	1715	77	5.0
Pyrococcus horikoshii	2064	154	7.6
Aeropyrum pernix	2694	370	14.0
ПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ			
Mycoplasma pneumoniae	677	39	5.9
Chlamydia trachomatis	894	36	4.3
Rickettsia prowazekii	834	28	3.6
Treponema pallidum	1031	77	8.3
Haemophilus influenzae	1709	96	6.2
Helicobacter pylori	1553	89	6.4
Mycobacterium tuberculosis	3918	187	5.0
СВОБОДНОЖИВУЩИЕ БАКТЕРИИ			
Aquifex aeolicus	1552	72	4.8
Thermotoga maritima	1846	198	11.6
Escherichia coli	4289	381	9.6
Pseudomonas aeruginosa	4036	411	10.1
Bacillus subtilis	4110	537	14.8
Synechocystis sp.	3169	219*	7.5

Эти сведения позволяют сделать ряд обобщений, касающихся закономерностей латерального генного переноса.

1) Доля латерально полученных генов варьирует у разных видов и может достигать 10-15% от общего числа генов в геноме.

2) Наибольшее количество переносов характерно для свободноживущих бактерий с широкими экологическими ареалами (почвенные бациллы, псевдомонады и др.).

3) Наименьшее число переносов обнаружено у большинства патогенных бактерий, живущих в узких эконишах; эти переносы, однако, весьма важны, так как определяют такие признаки как вирулентность и токсичность.
4) Переносы специфичны, поскольку приобретенный ген обнаруживается, как правило, только в клетках определенного вида или даже штамма.
5) Реже всего в горизонтальные переносы вовлечены гены информационных систем (транскрипции, трансляции, репликации), составляющие базовый геном. Продукты этих генов входят в сложные белковые комплексы, где "чужие" белки не встраиваются или не функционируют. Исключением являются гены, кодирующие аминоацил-тРНК-синтетазы, что связано с особенностями работы изоакцепторных транспортных РНК.
6) Чаще всего в горизонтальном переносе участвуют гены операционных систем, обслуживающих метаболизм, транспортные пути, механизмы сигнальной трансдукции. У многих бактерий среди латерально привнесенных генов большую долю составляют функционально неизученные гены и гены, не имеющие сходных ортологов в реципиентном организме.
7) В составе приобретенных сегментов ДНК часто обнаруживаются профаги, плазмиды, кассеты резистентности, гены белков, участвующих в процессах сайт-специфической и "незаконной" рекомбинации, обеспечивающей интеграцию "чужих" генов.

Горизонтальный перенос генов является главным источником инноваций, инструментом быстрого приобретения и возникновения новых генов, способных радикально изменить свойства клеток, расширить их адаптационный потенциал.

Изменчивость организмов в результате горизонтальной передачи генов реализуется через различные каналы генетической коммуникации - процессы коньюгации, трансдукции, трансформации, процессы переноса генов в составе векторов - плазмид, вирусов, мобильных элементов. Активный перенос генов может происходить в симбиотических, паразитарных или ассоциативных

системах, где осуществляется физический контакт клеток. В сущности, современная генетическая инженерия, использующая разного типа векторы, базируется на принципах горизонтального переноса генов, хотя еще недавно не было четкого понимания того, что такого рода генная инженерия широко распространена в природе и играет важную роль в эволюции (*Турова, 2009*). И только работы в области геномики в последние 10 лет доказали, что горизонтальный перенос генов был и остается (особенно в мире прокариот) одним из главных механизмов видообразования. Конечно, в ходе вертикальной эволюции повышалась степень автономизации организмов, возникали и совершенствовались барьеры, препятствующие горизонтальным генным переносам и «размыванию» геномов. Это касалось и ограничения контактов между организмами, механизмов проникновения и транспортировки молекул ДНК, действия систем рестрикции, разрушающих «чужую» ДНК, репаративных механизмов, обеспечивающих стабильность собственных геномов. Поэтому частота горизонтальных переносов была наиболее высокой на ранних этапах становления биосферы и снижалась по мере эволюции высших эукариот с усложнением организации генетического аппарата и развитием систем репродуктивной изоляции.

Суммируя представления о роли горизонтального переноса генов в биологической эволюции можно сделать следующее заключение. Во-первых, геномика не дает информации о том, какие конкретные виды организмов были первичными донорами генов. Обнаруживаемые в геномах чужеродные гены могли попасть туда через цепочку промежуточных хозяев. Согласно схеме Ф.Дулитла, автора термина «Латеральная геномика», на самых ранних этапах эволюции существовало общее генное «коммунальное хозяйство» в неустоявшихся предковых клетках, между которыми происходил активный горизонтальный обмен генами. В этот период шло накопление генетической информации с последующей автономизацией клеток, давших начало отдельным таксономическим линиям. Картина эволюционных связей в мире предковых

прокариот представляла собой не столько ветвящееся дерево, сколько своего рода мицелий с переплетенной сетью горизонтальных переносов в самых разнообразных и неожиданных направлениях, диктуемых возможностями физических контактов клеток в общих или перекрывающихся экологических нишах. Поэтому и геномы прокариот и эукариот мозаичны. Данные геномики позволяют утверждать, что в ходе эволюции происходили массивные генные переносы как внутри царств, так и между ними. Многие организмы (в первую очередь прокариоты) участвовали в горизонтальных переносах как «проточные» емкости. Если бы в процессе эволюции энтеробактерия *Escherichia coli* только приобретала, но не теряла гены, то размер ее генома должен был бы удвоится за 100 млн. лет с тех пор как произошла дивергенция с близкородственной бактерией *Salmonella*. Этот расчет сделан на основе применения метода «молекулярных часов». Но размер генома *E.coli* почти не изменился за это длительное время: геномный анализ выявил не только приобретение большого числа генов, но и отсутствие многих «старых» генов, обнаруживаемых у сальмонеллы. «Захваченные» гены могут сохраниться в геноме, но могут и подвергнуться элиминации или переносу в клетки другого организма. Так как в ходе эволюции происходит амелиорация чужих генов, то по изменению нуклеотидного состава и частоты встречаемости кодонов можно выявить те гены, которые пришли давно, а какие появились недавно. Баланс генных потоков, приводящих к приобретению и утрате генов, определяет не только адаптивную изменчивость организмов, но и поддержание оптимизированного размера генома. Скорости генных потоков у разных групп организмов различны и влияют на темпы эволюции геномов. Геномный анализ позволяет сопоставить время приобретения и утраты определенных генов с геологическими эпохами, экологическими кризисами и региональной динамикой биоты (по крайней мере, в отношении геномов модельных видов прокариот и протистов). Другое обобщение заключается в том, что не только сам геном, но и механизмы горизонтального переноса генов являются объектами эволюционного процесса. Эволюционируют

каналы генетической коммуникации, механизмы рекомбинации, участвующие в «приживлении» или «отторжении» чужих генов. Методы геномики помогают исследовать закономерности эволюции механизмов рекомбинации, их роль в изменчивости организмов. Если в какие-то периоды глобальных геосферных и биосферных перемен меняется диапазон векторных систем (вирусов, плазмид, мобильных элементов и т.п.), повышается рекомбинационная активность и частота горизонтальных переносов генов, то увеличивается и вероятность приобретения новых генов, обеспечивающих селективные преимущества клеток. Это не менее важный фактор эволюции, чем изменение темпов спонтанного или индуцированного мутагенеза. Волны горизонтального переноса генов могут быть инициированы повышением плотности контактирующих популяций. Там, где нет активных контактов, не будет и эффективного переноса генов. Особенно результативны такие процессы в многокомпонентных сообществах, где взаимодействуют различные организмы, метаболически связанные между собой. Геофизические, климатические, экологические факторы, безусловно, влияют на уровень и диапазон латерального переноса генов и, тем самым, на темпы и направления биологической эволюции.

В рамках сальтационной теории неравномерной по темпам эволюции анализ механизмов и закономерностей горизонтального переноса генов дает новый ключ к изучению корреляции геосферных изменений и биологической эволюции на планете (http://www.bionet.nsc.ru/live/liveprint.php?f=doclad&p=shestakov).

С развитием молекулярно-биологических методов, геносистематики и накоплением экспериментальных данных появились и новые проблемы, связанные главным образом с противоречиями между данными молекулярной систематики и традиционными представлениями, основанными на анализе фенотипа (*Турова, 2009*). По-видимому, существуют объективные противоречия, обусловленные естественными закономерностями эволюционных взаимоотношений организмов. Изучение этих закономерностей является ключевой проблемой современной полифазной систематики.

Глава 6. Идентификация метаболически активных клеток прокариот в почвах с применением молекулярно-биологического флюоресцентномикроскопического метода анализа fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Метод in situ-гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (FISH - fluorescence *in situ* hybridisation) совмещает возможности идентификации и определение численности отдельных филогенетических групп микроорганизмов в различных природных субстратах, широко используется в практике современных исследований для изучения микробных сообществ в морских и пресноводных экосистемах, торфах и ризосфере растений, а также множестве других природных и антропогенных сред (*Панкратов и др., 2005; Dedysh et al., 2001; Neef et al., 1998; Rabus et al., 1999; Amann R.I., Ludwig W., 2000*). Этот молекулярно-биологический метод основан на идентификации микроорганизмов по последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК, дает возможность исследовать микробное разнообразие непосредственно *in situ,* минуя стадии высевов на питательные среды, и позволяет учесть живые, метаболически активные клетки, в том числе и в почвенных образцах различной природы. Основным приёмом, позволяющим оценить разнообразие архей и бактерий в наземных и водных экосистемах, является метод создания библиотек клонов на основе амплификации и анализа гена 16S рРНК (*Hugenholtz et al., 1998*).

6.1. Отделение бактериальных клеток от элементов почвы

С целью десорбции клеток бактерий от почвенных частиц суспензию (разведение зависит от типа почвы; для почв богатых гумусом используется разведение 1:10) обрабатывают на ультразвуковой установке (2 мин., сила тока

0,40 А, частота 22кГц). Клетки микроорганизмов отделяют от крупных частичек почвы однократным центрифугированием при 2 тыс оборотов в течение 10 минут. Осадок удаляют. Клетки из полученной суспензии осаждают (5 мин при 10 тыс. оборотов); далее работают с полученным осадком, а супернатант сливают пипеткой.

Примечание: перед центрифугированием обязательно уравновесить стаканы центрифуги. Удобнее использовать микропробирки на 2 мл.

6.2. Фиксация образцов клеток прокариот или почвенных экстрактов

Фиксацию материала осуществляют с использованием формальдегида в качестве фиксирующего агента (*Amann et al., 1995; Pernthaler at al., 2002; Sekar et al., 2003*).

Здесь и далее используют стерильную дистиллированную воду.

Полученный в пункте 1.1 осадок ресуспензируют 0,5 мл фосфатного буфера (PBS буфер: NaCl - 8.0 г, КС1 - 0.2 г, Na_2HP0_4 - 1.44 г, NaH_2P0_4 - 0.2 г, H_20 - I л, pH 7.0). Добавляют 1.5 мл 4% раствора формальдегида в фосфатном буфере*. Инкубируют при комнатной температуре на качалке в течение 1,5 час. Фиксированный материал собирают центрифугированием (10000 об/мин в течение 5 мин), после двукратного промывания PBS буфером клетки ресуспензируют в смеси этанола и фосфатного буфера (1:1 v/v) и до анализа хранят при минус 20°С.

Примечание: Этанол можно не использовать, если образцы не предполагается долго хранить

* При приготовлении 4% раствора формальдегида в фосфатном буфере рекомендуется использовать следующую методику: в герметично закрывающейся 15 мл пробирке смешать

10 мл PBS-буфера и 0,4 г. параформальдегида, инкубировать на водяной бане при +65 - +70°С до полного растворения параформальдегида (60-90 мин), охладить до комнатной температуры. Отфильтровать через фильтры с **диаметром** пор 0,22 мкм.

Примечание: работы с параформальдегидом проводить в шкафу под тягой.

6.3. Нанесение фиксированного образца на стекло

Фиксированный образец обрабатывают на вортексе в течение 2 минут с целью дополнительной десорбции клеток с оставшихся мелких частиц почвы.

1 мкл суспензии фиксированного образца наносят на предметные стекла для гибридизации с окошками, разделенные тефлоновым покрытием. Для улучшения связывания клеток со стеклом, образцы желательно наносить на предварительно покрытые желатином стекла (0,1% раствор желатина в дистиллированной воде).

Для увеличения проницаемости клеточных стенок бактерий нанесенные на стёкла, фиксированные препараты обрабатывают раствором лизоцима (10 мг в 1 мл 0.05 M EDTA и 0.1 M TRIS HC1, 1:1 v/v, pH 8.0) (*Sekar et al., 2003*). Полученные препараты выдерживают в течение 12-24 ч при комнатной температуре.

Предметное стекло промывают в градиенте концентраций этанола:

$$\underbrace{50\% \rightarrow 80\% \rightarrow 96\%}_{\text{по 3 минуты для каждой концентрации}}$$

Стекло просушивают на воздухе около газовой горелки 1-2 мин.

6.4. Гибридизация фиксированных образцов с определенными зондами

Гибридизацию препаратов с флуоресцентно-мечеными зондами проводят в соответствии с методикой Amann (1995). Для гибридизации используют набор рРНК- специфичных олигонуклеотидных меченных флуоресцентным красителем Cy3 (Си три) зондов, разработанных для детекции представителей доменов Bacteria и Archaea, а также отдельных филогенетических групп в пределах Bacteria (Табл. 1). Условия гибридизации различаются в зависимости от используемого зонда. В таблице 2 приводятся концентрации формамида в гибридизационном буфере и концентрации NaCl в буфере для промывки, зависящие от используемого зонда.

Буфер для гибридизации (из расчета 1 мл буфера на стекло)

Состав буфера зависит от зонда и приведен в табл.2. Готовится в микропробирках.

850 мкл буфера для гибридизации наносят на фильтровальную бумагу, выстилающую 50 мл пузырек. Флакон герметично закрывают и помещают в гибридизационную камеру (термостат) на 30 минут (46^0C) для насыщения парами буфера.

Оставшиеся 150 мкл буфера одновременно помещают в микропробирке (2 мл) на водяную баню на 3^0C выше, чем в гибридизационной камере (49^0C).

Предметное стекло с клетками помещают во флакон с фильтровальной бумагой и инкубируют в гибридизационной камере 15-20 мин.

На прогретое стекло наносят

- оставшийся буфер, при температуре 49^0C (10 мкл на одно окошко)
- зонд (1 мкл раствора олигонуклеотидного зонда (50нг/мкл) на одно окошко).

Примечание : Если зонд состоит из нескольких составляющих (зонд EUB 338 микс состоит из трех составляющих), то на одно окошко наносится эквивалентное количество зонда (1 составляющая – 1 мкл, 3 составляющих – 3 мкл)

Зонд хранится при температуре – минус 20^0С,

С зондом работают на аккумуляторе холода (при температуре $+9^o$С).

Предметное стекло помещают обратно во флакон и в гибридизационную камеру на 1-2 часа.

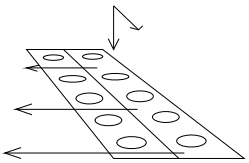
Промывочный буфер

Состав буфера для промывки также зависит от зонда и указан в табл. 2.

Его готовят во флаконе на 50 мл, до 50 мл доводят стерильной дистиллированной водой. Приготовленный буфер ставят в термостат на 46^0С.

Предметное стекло из гибридизационной камеры промывают от гибридизационного буфера с зондом с использованием теплого промывочного буфера (46^0С).

Примечание: Стекла надо промывать очень аккуратно, чтобы не смыть клетки с окошек и не смешать образцы (на рис 4. стрелками указано направление жидкости)



На одно стекло идет около 3-5 мл буфера.

Рис.4 Промывание клеток от гибридизационного буфера

Стекло помещают в пластиковый флакон с буфером для промывки вертикально и инкубируют на водяной бане около 20 мин для удаления избытка зонда (49^0С).

Стекло ополаскивают дистиллированной водой, подсушивают на воздухе.

По завершении процедуры гибридизации препараты докрашивают водным раствором акридина оранжевого (разведение 1:10000; 2 мин). Избыток флуорохрома удаляют в процессе промывки, для чего стекла погружают на 10 мин в кюветы с дистиллированной водой и затем высушивают.

6.5. Микроскопирование препаратов, приготовленных с использованием молекулярно-биологического метода (FISH)

Препараты анализируют с использованием люминесцентного микроскопа ZEIZZ Mikroskop Axioskop 2 plus (Германия) со светофильтрами Filter set 15 (λ 546 нм) для Cy3-меченых зондов и Filter set 09 (λ 450-490 нм) для окраски акридином оранжевым. Численность целевых групп микроорганизмов в образцах определяют путем учета количества гибридизованных с зондами клеток в 50 полях зрения микроскопа на одной ячейке, с последующим расчетом численности соответствующих популяций на 1 г почвы (см. формулу (1)).

Количество микробных клеток, содержащихся в 1 г почвы, вычисляют по формуле: $N=S_1an/vS_2c$, (1), где N - число клеток (длина мицелия, мкм) на 1 г почвы; S_1 - площадь препарата (мкм^2); a – количество клеток (длина мицелия, мкм) в одном поле зрения (усреднение производится по всем препаратам); n – показатель разведения почвенной суспензии (мл); v – объем капли, наносимой на стекло (мл); S_2 – площадь полей зрения микроскопа (мкм^2); c – навеска почвы (г). Удельную массу микроорганизмов принимают равной 1 г/см^3, а содержание воды в клетках – 80%. Показатели сухой биомассы для одной бактериальной клетки объемом 0,1 мкм^3 – $2*10^{-14}$г, для 1м мицелия актиномицетов диаметром 0,5 мкм – $3,9*10^{-8}$г (*Звягинцев, 1987*).

Зонд	Целевая группа организмов	Целевой участок 16S рРНК	Нуклеотидная последовательность зонда (5′-3′)	Формамид, %[а]	NaCl, мМ[б]	Ссылка
EUB338 I EUB338 II EUB338Ш	Bacteria Bacteria (Planctomycetales) Bacteria (Verrucomicrobiales)	338-355	GCT GCC TCC CGT AGG AGT GCA GCC ACC CGT AGG TGT GCT GCC ACC CGT AGG TGT	20	225	Amann et al., 1990
ARCH915	Archaea	915-934	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT TCG	30	112	Stahl et al., 1991
ALFlb ALF968	*Alphaproteobacteria*	19-35 968-986	CGT TCG **Y**TC TGA GCC AG[в] GGT AAG GTT CTG CGC GTT	20	225	Manz et al., 1992
BET42a	*Betaproteobacteria*	1027-1043[г]	GCC TTC CCA CTT CGT TT	35	80	Manz et al., 1992
GAM42a	*Gammaproteobacteria*	1027-1043[г]	GCC TTC CCA CAT CGT TT	35	80	Manz et al., 1992
SRB385Db	*Deltaproteobacteria*	385-402	CGG CGT TGC TGC GTC AGG	20	225	Rabus et al., 1999
CF319a CFB560	*Bacteroidetes*	319-336 560-575	TGG TCC GTG TCT CAG TAC **W**CC CTT TAA ACC CA**R** T	35 30	80 112	Manz et al., 1996
HGC69a	*Actinobacteria*	1901-1918[г]	TAT AGT TAC CAC CGC CGT [д]	25	159	Roller et al., 1994
LGC354A, LGC354B, LGC354C[е]	*Firmicutes*	354-371	TGG GAA GAT TCC CTA CTG C, CGG GAA GAT TCC CTA CTG C, CCG GAA GAT TCC CTA CTG C	35	80	Meier et al., 1999
HoAc1402	*Acidobacteria*	1401-1420	CTT TCG TGA TGT GAC GGG[ж]	10	450	Juretschko et al., 2002
Ver138 Ver1455	*Verrucomicrobia*	138-155 1455-1472	CGA GCT ATT CCC CTC TTG CCA TCC ATA CCT TCG GCA	10	450	Dedysh et al., 2007
PLA46 PLA886	*Planctomycetes*	46-63 *886-906*	GAC TTG CAT GCC TAA TCC GCC TTG CGA CCA TAC TCC C	30 30	112 112	Neef et al., 1998

Таблица 3. рРНК-специфичные олигонуклеотидные зонды

[а] - концентрация формамида в гибридизационном буфере, [б] - концентрация NaCl в буфере для промывки, [е] - Y = C или T, W = A или T, R = A или G, [г] - целевая молекула—23 S рРНК, [д] - зонд используется в сочетании с немеченным олигонуклеотидом 5'-TATAGTTACGGCCGCCGT-3', [е] - эквимолярная смесь трех меченных олигонуклеотидов.

Буфер для гибридизации

	Формамид %	Формамид, мкл	H20, мкл	5M NaCl, мкл	1M Tris HCl - мкл	10% SDS мкл
Eubacteria mix	20	200	600	180	20	1
Archaea	30	300	500	180	20	1
Alphaproteobacteria	20	200	600	180	20	1
Betaproteobacteria	35	350	450	180	20	1
Gammaproteobacteria	35	350	450	180	20	1
Deltaproteobacteria	20	200	600	180	20	1
Bacteroidetes	35	350	450	180	20	1
Chitinophaga	20	200	600	180	20	1
Planctomycetes	30	300	500	180	20	1
Actinobacteria	25	250	550	180	20	1
Firmicutes	35	350	450	180	20	1
Acidobacteria	10	100	700	180	20	1
Verrucomicrobia	10	100	700	180	20	1

Буфер для промывки

	Формамид %	NaCl, мМ	5M NaCl, мл	0,5M Na-EDTA pH8 мкл	1M Tris HCl - мкл	10% SDS мкл
Eubacteria mix	20	225	2,15	500	1	50
Archaea	30	112	1,02	500	1	50
Alphaproteobacteria	20	225	2,15	500	1	50
Betaproteobacteria	35	80	0,7	500	1	50
Gammaproteobacteria	35	80	0,7	500	1	50
Deltaproteobacteria	20	225	2,15	500	1	50
Bacteroidetes	35	80	0,7	500	1	50
Chitinophaga	20	225	2,15	500	1	50
Planctomycetes	30	112	1,02	500	1	50
Actinobacteria	25	159	1,49	500	1	50
Firmicutes	35	80	0,7	500	1	50
Acidobacteria	10	450	4,4	500	1	50
Verrucomicrobia	10	450	4,4	500	1	50

Таблица 4. Состав буфера для гибридизации и буфера для промывки, используемых в работе

6.6. Оценка численности метаболически активных представителей доменов Archaea и Bacteria в почвах с хитином и без него при различных температурах

С использованием молекулярно-биологического метода in situ-гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами установлено, что в почвах с хитином по сравнению с контролем отмечается возрастание численности метаболически активных представителей доменов как Bacteria, так и Archaea при всех исследуемых температурах (рис. 5). Число метаболически активных клеток представителей домена Bacteria в образцах чернозема типичного при добавлении хитина на 10-е сутки эксперимента составило от 0,7 до $1,5x10^9$ клеток $г^{-1}$ почвы для 5 и 27^oC, соответственно, что в 2 раза превышает численность этой группы в контрольных вариантах. В глее-слабоподзолистой почве с хитином численность эубактерий была максимальной при пониженной температуре и составляла $1,0x10^9$ клеток $г^{-1}$ почвы, тогда как при 27^oC в аналогичных образцах она не превышала $0,6x10^9$ клеток $г^{-1}$ почвы. Число клеток, выявленных в образцах бурой пустынностепной почвы с хитином гибридизацией с 16S рРНК-специфичным универсальным зондом на представителей домена Bacteria возрастало при повышенной температуре, в 2 раза превышая таковую в образцах, инкубируемых при 27^oC.

Численность представителей домена Archaea, гибридизованных с зондом ARCH915 во всех почвах была на порядок ниже и варьировала в диапазоне 0,6 – $3,5x10^8$клеток $г^{-1}$почвы. Наибольшее увеличение численности Archaea наблюдалось при температуре 50^oC в бурой пустынно-степной почве с хитином. Не исключено, что высокие температуры в течение вегетационного периода в этой почве приводят к формированию термотолерантных и термофильных представителей Archaea, среди которых

известны бактерии, способные к образованию хитиназы (*Tanaka et al., 1999; Andronopoulou , Vorgias, 2003; Gao et al., 2003*). Меньше всего архей среди исследуемых почв обнаруживалось в образцах чернозема типичного.

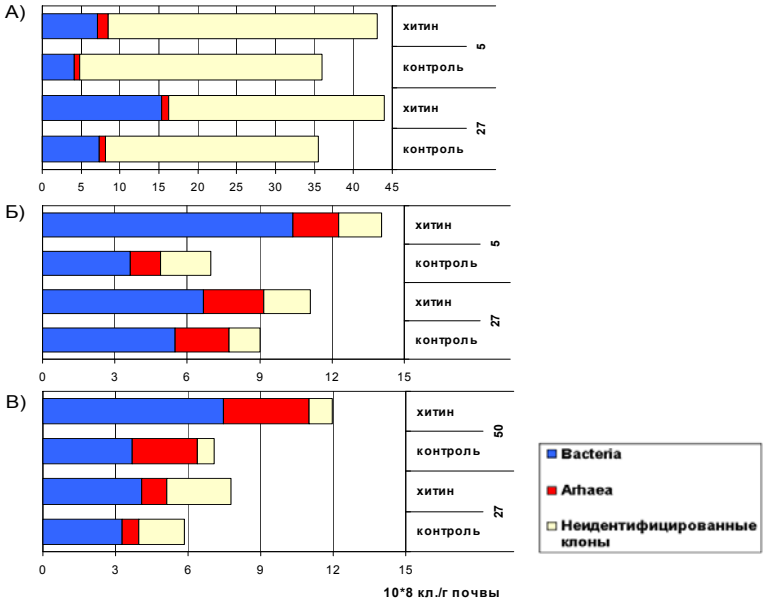


Рис. 5. Соотношение численности эубактерий, архей и неидентифицируемых зондами прокариотных микроорганизмов в образцах исследованных почв с хитином и без него при различных температурах: А) – чернозем типичный, Б) – глее-слабоподзолистая почва и В) – бурая пустынно-степная почва.

В целом суммарная доля идентифицируемых метаболически активных клеток, обнаруженных гибридизацией с универсальными зондами на представителей доменов Bacteria и Archaea, составила в образцах исследуемых почв от 20 для чернозема до 90% для глее-слабоподзолистой и бурой пустынно-степной почв от общего числа клеток, выделенных

окрашиванием акридином оранжевым. В качестве объяснений относительно низкой доли идентифицируемых универсальными зондами клеток в черноземе могут быть предложены следующие гипотезы. Первая гипотеза говорит о том, что значительная доля пула прокариотных организмов чернозема представлена покоящимися и метаболически неактивными формами клеток (не выявляемые методом FISH). Вторая гипотеза предполагает присутствие в данной почве представителей филогенетических групп архей и бактерий, которые не могут быть идентифицированы зондами EUB338-mix. Большая часть идентифицированных зондами в черноземе клеток была представлена мелкими клетками, диаметр которых не превышал 0,5 мкм. Такие формы составляют до 50-65% от общего числа клеток, обнаруживаемых в черноземе окраской акридином оранжевым. Эти микроорганизмы также не удается обнаружить с помощью олигонуклеотидных зондов либо из-за несовпадения целевых последовательностей этих организмов и зондов, либо из-за чрезвычайно низкой интенсивности флуоресцентного сигнала гибридизованных с зондами клеток. Кроме того, на идентификацию микробных клеток зондами предположительно влияет гранулометрический состав исследуемой почвы. Высокое содержание илистой фракции в черноземе способствует более сильной сорбции клеток на илистых частицах, чем в почвах более легкого гранулометрического состава, и как следствие, снижению количества определенных клеток.

6.7. Идентификация отдельных метаболически активных филогенетических групп домена Bacteria, оценка их численности и биомассы в почвах

Для идентификации и оценки численности филогенетических групп эубактерий, населяющих исследованные почвы, нами был применен набор

из 7 группоспецифичных олигонуклеотидных зондов, наиболее широко применяемых в практике современных молекулярно-экологических исследований (табл. 3). Предполагаемый спектр детекции этих зондов охватывает представителей нескольких филогенетических ветвей домена Bacteria, а именно, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes, Actinobacteria* и *Firmicutes.* Примененные в настоящей работе зонды охватывали четыре из пяти известных классов ветви *Proteobacteria – Alpha-, Beta-, Gamma* и *Deltaproteobacteria.*

Оценка численности представителей отдельных филогенетических групп домена Bacteria в образцах глее-слабоподзолистой и бурой пустынно-степной почв при 27°C показала возрастание численности бактерий, относящиеся к филогенетической ветви *Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes*, а также представителей *Gammaproteobacteria* в вариантах с хитином по сравнению с контролем (рис. 6.1 и 6.2). Кроме того, в бурой пустынно-степной почве отмечено также увеличение численности *Betaproteobacteria*. Эти особенности обясняются тем, что ряд представителей этих групп являются активными гидролитиками, способными разрушать труднодоступные полимеры. Бактерии рода *Cytophaga*, например, входящие в состав филогенетической группы *Bacteroidetes* в большинстве природных экосистем приурочены к разлагающемуся органическому веществу и участвуют в деструкции нерастворимых полимерных соединений углерода – целлюлозы и хитина (*Kirchman, 2002; Krsek M., 2003*). Наиболее многочисленными в исследованных почвах оказались представители грамположительных бактерий *Actinobacteria* и *Firmicutes*, их численность варьировала от 5,1 до 18x10^{7} клеток г$^{-1}$ почвы в бурой пустынно-степной и глее-слабоподзолистой почвах с хитином, соответственно.

Число метаболически активных клеток *Gammaproteobacteria* в этих почвах не превышало 5,2x10^7 клеток $г^{-1}$ почвы.

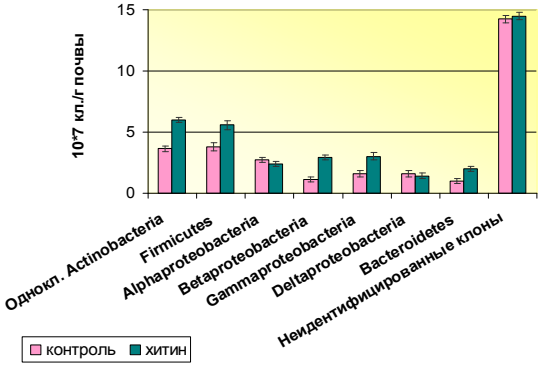


Рис. 6.1. Численность отдельных филогенетических групп домена Bacteria микробного комплекса бурой пустынно-степной почвы с добавлением хитина и без него при 27°С.

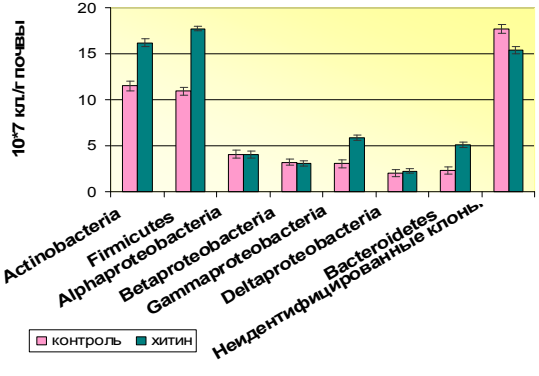


Рис. 6.2. Численность отдельных филогенетических групп домена Bacteria микробного комплекса глее-слабоподзолистой почвы с добавлением хитина и без него при 27°С.

Идентифицированные формы эубактерий в глее-слабоподзолистой почве с хитином при 27°С составляли 78% от общего числа клеток,

выявленных с помощью зонда EUB-mix, в бурой пустынно-степной почве – 59% (рис. 7)

Среди выявленных группо-специфичными зондами клеток в глее-слабоподзолистой почве *Actinobacteria, Firmicutes* и *Proteobacteria* составляли равные доли в хитинолитическом комплексе. В бурой пустынно-степной почве наблюдается увеличение доли *Proteobacteria* при одновременном снижении *Firmicutes* и *Actinobacteria*.

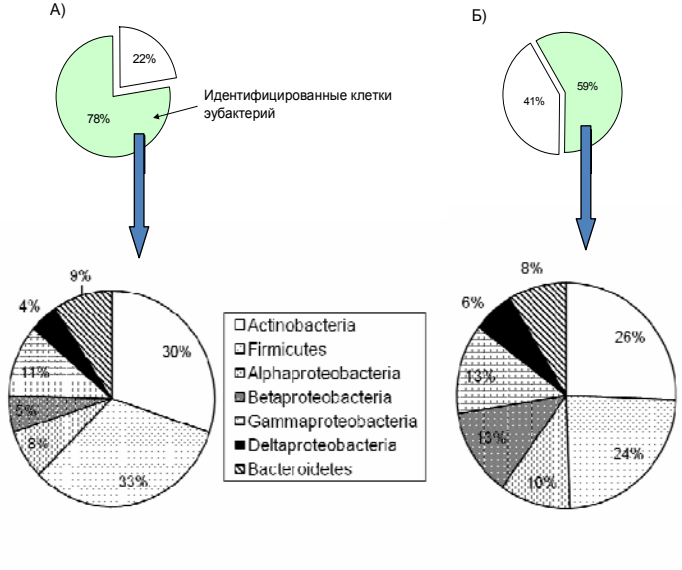


Рис. 7. Доля представителей отдельных филогенетических групп, выявленных используемыми в настоящей работе группоспецифичными зондами, от общего числа идентифицированных эубактерий в хитинолитическом комплексе глее-слабоподзолистой (А) и бурой пустынностепной (Б) почв при 27°С.

При понижении температуры до 5°С в хитинолитическом комплексе чернозема и глее-слабоподзолистой почв наблюдается возрастание численности группы *Firmicutes* и сокращение грамположительных бактерий с

высоким содержанием Г+Ц пар в ДНК, относящихся к филогенетической группе *Actinobacteria* по сравнению с их численностью в этих почвах при 27°С (рис. 8.1).

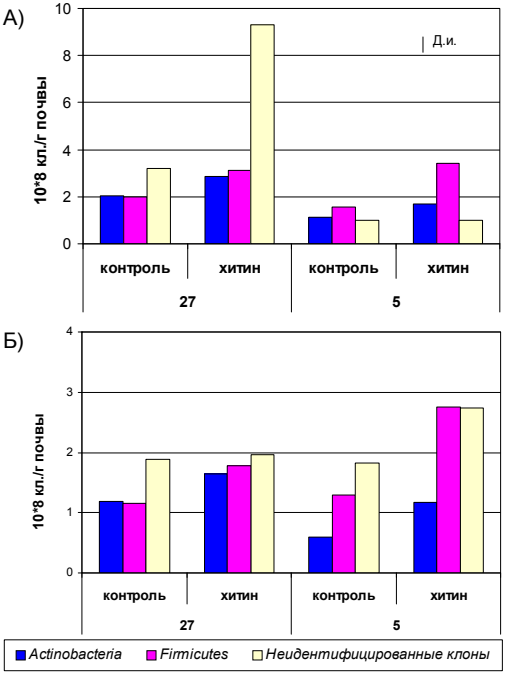


Рис. 8.1. Численность представителей филогенетических групп *Firmicutes,* одноклеточных форм *Actinobacteria* и неидентифицированных клеток в черноземе типичном (А) и глее-слабоподзолистой почве (Б) при 5 и 27°С.

Произведенный через расчет биомассы каждой филогенетической группы учет мицелиальных форм *Actinobacteria*, показывает заметное преобладание биомассы этих форм и ее увеличение в исследованных почвах

с хитином при всех рассматриваемых температурах (рис. 8.2).

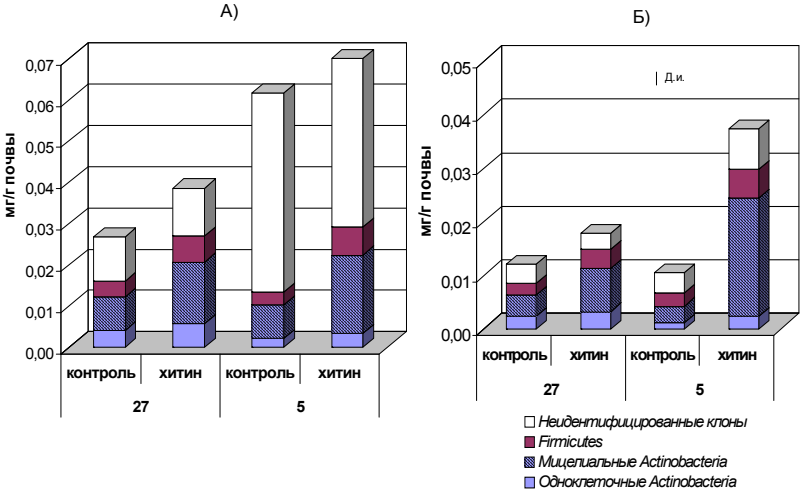


Рис. 8.2. Биомасса (мг/ г почвы) отдельных филогенетических групп домена Bacteria микробного комплекса чернозема типичного (А) и глее-слабоподзолистой почвы (Б) при температуре 5 и 27°С.

В хитинолитическом комплексе бурой пустынно-степной почвы при 50°С наблюдается увеличение общей численности неидентифицированных форм эубактерий (рис. 9.1). Основной причиной этого предположительно является уникальность прокариотного населения этой экосистемы, значительная доля которого, по-видимому, относится к плохо изученным группам бактерий. Численность представителей филогенетических групп *Firmicutes* и одноклеточных форм *Actinobacteria* в бурой пустынно-степной почве с повышением температуры от 27 до 50°С практически не изменялась как в опытном, так и контрольном вариантах (рис. 9.1.). Однако, среди грамположительных бактерий с высоким содержанием Г+Ц пар в ДНК,

относящихся к филогенетической ветви *Actinobacteria,* заметно превалируют мицелиальные формы актинобактерий, биомасса которых в почве с хитином увеличивается на порядок (рис. 9.2).

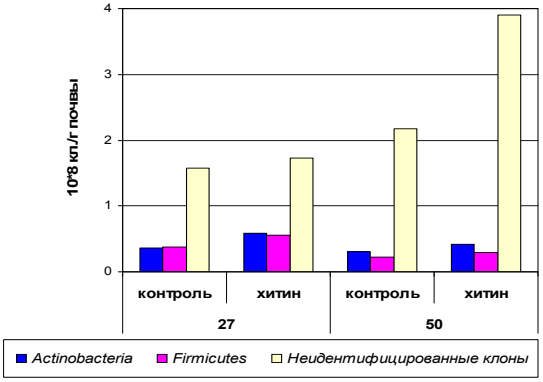


Рис. 9.1. Численность представителей филогенетических групп *Firmicutes,* одноклеточные *Actinobacteria* и неидентифицированных клеток в бурой пустынно-степной почве при температуре 27 и 50°С.

Рис. 9.2. Биомасса (мг/г почвы) мицелиальных и одноклеточных форм представителей филогенетической ветви *Actinobacteria* в микробном комплексе бурой пустынно-степной почвы с хитином и без него при 27 и 50°С.

Методом молекулярной диагностики *in situ* (FISH) показано, что хитинолитические прокариотные сообщества исследованных почв включают представителей доменов как Bacteria так и Archaea. Среди выявленных прокариотных агентов домена Bacteria в микробной деструкции хитина при всех исследованных температурах доминировали представители филогенетических групп *Actinobacteria* и *Firmicutes.* Эти группы организмов наиболее часто упоминаются в числе основных агентов деструкции органического вещества в водных (Pourcher et. al., 2001) и наземных экосистемах (*Звягинцев, Зенова; 2001*). Высокая численность растущих, физиологически активных клеток представителей *Bacteroidetes, Gammaproteobacteria* и *Betaproteobacteria* в исследованных почвах с хитином указывают на то, что они активно участвуют в деструкции этого полимера при широком диапазоне температур.

Таким образом, применение метода FISH позволяет оценить численность метаболически активных клеток микроорганизмов, а также установить филогенетическую принадлежность физиологически активных организмов, населяющих почвы. Использование этого молекулярно-биологического метода анализа идентифицирует до 10^9 клеток в 1 $г^{-1}$ почвы. Помимо этого, молекулярный *in situ* анализ микробного населения позволяет обнаружить ряд филогенетических групп домена Bacteria, которые не выявляются высевом на традиционные питательные среды, но при этом являются важным компонентом бактериального сообщества почв.

Литература

1. Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Турова Т.П., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф. Изучение нуклеотидных последовательностей *nifH* генов у представителей метанотрофных бактерий// Микробиология. 2002. Т. 71. № 4. С. 1-9.

2. Задорина Е.В., Слобода Н.В., Булыгина Е.С., Колганова Т.В., Кравченко И.К., Кузнецов Б.Б. Оценка разнообразия диазотрофов в торфяной почве методом клонирования гена *nifH*. //Микробиология. 2009. Том 78. №2. С. 252-260.

3. Запороженко Е.В., Слободова Н.В., Булыгина Е.С., Кравченко И.К., Кузнецов Б.Б. Экспресс-метод выделения ДНК из бактериальных сообществ различных почв // Микробиология. – 2006. – Т.75. – С. 127-134.

4. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: Изд-во МГУ. 1987. 256 с.

5. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. М.: ГЕОС. 2001. 257 с.

6. Кравченко И.К., Дорошенко Е.В. Азотфиксирующая активность торфяной почвы верхового болота // Микробиология. - 2003. - Т. 72. - № 1. - С. 111-116.

7. Нетрусов А.И., Бонч-Осмоловская Е.А., Горленко В.М., Иванов М.В., Каравайко Г.И., Кожевин П.А., Колотилова Н.Н., Котова И.Б., Максимов В.Н., Ножевникова А.Н., Семенов А.М., Турова Т.П., Юдина Т.Г. Экология микроорганизмов. Под ред. Нетрусова А.И. – М.: Академия, 2004. – 272 с.

8. Панкратов Т.А., Белова С.Э., Дедыш С.Н. Оценка филогенетического разнообразия прокариотных микроорганизмов в сфагновых болотах с использованием метода FISH.// Микробиология, 2005. Т. 74, №6, С. 831-837.

9. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семенов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. «ПЦР «в реальном времени»». Под ред Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.: ил.

10. Телков М.В., "Кари Маллис, изобретатель ПЦР"// «Химия и жизнь» №8, 2006. http://elementy.ru/lib/430350

11. Турова Т.П. Применение методов геносистематики для решения вопросов таксономии и изучения биоразнообразия прокариот. Автореф. Дисс. 2009. 86с.

12. Akiba T, Koyama K, Ishiki Y, Kimura S, Fukushima T. On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of Shigella. Jpn J Microbiol. 1960. № 4. P. 219-27. PMID 13681921.

13. Amann R.I., Krunholz L., Stahl D.A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. Bacteriol., 1990. V. 172. P. 762-770.

14. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.-H. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation // Microbiol. Rev. – 1995. – V. 59. – № 1. – P. 143-169.

15. Amann R.I., Ludwig W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology //FEMS Microbiol. Reviews, 2000. V. 24. P. 555-565.

16. Andronopoulou E. and Vorgias C. E. Isolation, cloning, and overexpression of a chitinase gene fragment from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*: semi-denaturing purification of the recombinant peptide and investigation of its relation with other chitinases. // Protein Expression and Purification, 2004. V. 35. Iss. 2. P. 264-271.

17. Burgmann H., Widmer F., von Sigler W., Zeyer J. New Molecular Screening Tools for Analysis of Free-Living Diazotrophs in Soil // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. № 1. – P. 240-247.

18. Dang C, Jayasena S.D. Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number tergets by PCR // J. Mol Biol.. 1996. 264: 268-278.

19. Dedysh S.N., Derakshani M., Liesack W. Detection and enumeration of methanotrophs in acidic *Sphagnum* peat by 16S rRNA fluorescence in situ hybridisation, including the use of newly developed oligonucleotide probes for *Methylocella palustris II* Appl. Environ. Microbiol., 2001. V. 67. P. 4850-4857.

20. Dedysh S.N., Belova S.E., Bodelier P.L.E., Smirnova K.V. Khmelenina V.N., Cidthaisong A., Trotsenko Y.A., Liesack W., Dunfield P.F. *Methylocystis heyeri* sp. nov., a novel type II methanotrophic bacterium possessing “signature” fatty acids of type I methanotrophs// Int. J. Syst. Microbiol. 2007. V 57. P. 472-479.

21. Diez B., Pedros-Alio C., Marsh T.L., Massana R. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. – № 7. – P. 2942-2951.

22. Duineveld B., Kowalchuk G.A., Keuzer A., van Elsas J.D., van Veen J.A. Analysis of Bacterial Communities in the Rhizosphere of Chrysanthemum via Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rRNA as Well as DNA Fragments Coding for 16S rRNA // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. – № 1. – P. 172-178.

23. Edwards U., Rogall T., Bloeker H., Ende M.D., Boeettge E.C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes, characterization of gene coding for 16S ribosomal RNA // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. P.7843-7853.

24. Frostergard A., Courtois S., Ramisse V., Clerc S., Ber-nillon D., Le Gall F., Jeannin P., Nesme X., Simonet P. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 5409-5420.

25. Juretschko S., Loy A., Lehner A., Wagner M. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach // Syst. Appl. Microbiol., 2002. V.25. P. 84-99.

26. Gao J., Bauer M. W., Shockley K.R., Pysz M.A. and Kelly R. M. Growth of Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* on Chitin Involves Two Family 18 Chitinases.// Appl Environ Microbiol. 2003; 69(6): 3119–3128.

27. Gregory L.G., Karakas-Sen A., Richardson D.J., Spiro S. Detection of genes for membrane-bound nitrate reductase in nitrate-respiring bacteria and in community DNA // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – V. 183. – № 2. – P. 275-279.

28. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions // Biotechnology. 1993. 11:1026-1030.

29. Holmes A. J., Costello A., Lidstrom M. E., Murrell J. C. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related // FEMS Microbiol. Lett. – 1995. – V. 132. – № 3. – P. 203-208.

30. Hugenholtz P., Goebel B.M. and Pace N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity // J. Bacterid, 1998. V. 180. P. 4765-4774.

31. Ibekwe A.M., Papiernik S.K., Gan J., Yates S.R., Yang C.-H., Crowley D.E. Impact of Fumigants on Soil Microbial Communities // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. – № 7. – P. 3245-3257.

32. Ikeda S., Omura T., Ytow N., Komaki H., Minamisawa K., Ezura H., Fujimura T. Microbial Community Analysis in the Rhizosphere of a Transgenic Tomato that Overexpresses 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase // Microbes and Environments. – 2006b. – V. 21. – № 4. – P. 261-271.

33. Jung S., Park S., Kim D., Kim Seung Bum. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Bacterial Community Profiles in the Rhizosphere of *cry1AC*-carrying *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* // J. Microbiol. – 2008. – V. 46. – № 1. – P. 12-15.

34. Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T. Methods of studying soil microbial diversity // J. Microbiol. Methods. – 2004. – V. 58. – P. 169-188.

35. Kirchman D. L. The ecology of Cytophaga –Flavobacteria in aquatic environments. // FEMS Microbiol. Ecol., 2002. V. 39. P. 91-100.

36. Koonin E.V., Makarova K.S., Arvind L. 2001. Annual Rev. Microbiol. v.55: 709-42

37. Krsek M., Wellington E.M.H. Assessment of chitin decomposer diversity within an upland grassland // Antonie van Leeuwenhoek. 2001. V. 79. P. 261-267.

38. Lukow T., Dunfield P.F., Liesack W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants // FEMS Microbiol. Ecol. – 2000. – V. 32. – № 3. – P. 241–247.

39. Lynch J.M., Benedetti A., Insam H., Nuti M.P., Smalla K., Torsvik V., Nannipieri P. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms // Biol. Fertil. Soils. – 2004. – V. 40. – P. 363-385.

40. Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M., Schleifer K.-H. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment// Microbiology, 1996. V. 142. P. 1097-1106.

41. Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K.-H. Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria:* problems and solutions// Syst. Appl. Microbiol., 1992. V. 15. P. 593-600.

42. Marschner P., Crowley D., Yang C.H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type // Plant and Soil. – 2004. – V. 261. – P. 199-208.

43. McDonald I. R., Murrell J. C. The methanol dehydrogenase structural gene *mxa*F and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63. – № 8. – P. 3218-3224.

44. Meier H., Amann R.,s Ludwig W.,s Schleifer K.-H. Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content// Syst. Appl. Microbiol, 1999. V. 22. P. 186-196.

45. Muyzer G. Genetic fingerprinting of microbial communities – present status and future perspectives // Methods of Microbial Community Analysis. – 1999. – P. 10.

46. Neef A., Amann R., Schlesner H., Schleifer K.-H. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of Planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes // Microbiology, 1998. V. 144. P. 3257-3266.

47. Omoregie E.O., Crumbliss L.L., Bebout B.M., Zehr J.P. Determination of nitrogen-fixing phylotypes in *Lyngbya* sp. and *Microcoleus chthonoplastes* cyanobacterial mats from Guerrero Negro, Baja California, Mexico // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – № 4. – P. 2119-2128.

48. Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. // Appl Environ Microbiol. 2002. V.68. №6. P.3094-3101.

49. Pourcher A-M., Sutra L., Hebe I., Moguedet G., Bollet C, Simoneau Ph., Gardan L. Enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from refuse of a landfill // FEMS Microbiology Ecology, 2001. V. 34. P. 229-241.

50. Prosser J.I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms // Plant and Soil. – 2002. – V. 244. – P. 9-17.

51. Qiu X., Wu L., Huang H., McDonel P.E., Palumbo A.V., Tiedje J.M., Zhou J. Evaluation of PCR-Generated Chimeras, Mutations, and Heteroduplexes with 16S rRNA Gene-Based Cloning // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. – № 2. – P. 880-887.

52. Rabus R., Wilkes H., Schramm A., Harms G., Behrends A., Amann R., Widdel F. Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the beta-subclass of *Proteobacteria II* Environ. Microbiol., 1999. V. 1. P. 145-157.

53. Ranjard L., Poly F., Nazaret S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment // Res. Microbiol. – 2000. – V. 151. – P. 167–177.

54. Reiter B., Burgmann H., Burg K., Sessitsch A. Endophytic *nif*H gene diversity in African sweet potato // Can. J. Microbiol. – 2003. – V. 49. – № 9. – P. 549–555.

55. Reysenbach A.-L., Giver L.J., Wickham G.S., Pace N.R. Differential Amplification of rRNA Genes by Polymerase Chain Reaction // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – V. 58. – № 10. – P. 3417-3418.

56. Roller C, Wagner M., Amann R., Ludwig W., Schleifer K.-H. In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides // Microbiology, 1994. V. 140. P. 2849-2858.

57. Rotthauwe J. H., Witzel K. P., Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amo*A as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63. – № 12. – P. 4704-4712.

58. Scorzetti G., Fell J.W., Fonseca A., Statzell-Tallman A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions // FEMS Yeast Research. 2002. V. 2. P. 495–517.

59. Sekar R., Pernthaler A., Pernthaler J., Warnecke F., Posch T. and Amann R. An improved protocol for quantification of freshwater *Actinobacteria* by fluorescence in situ hybridization. // Appl Environ Microbiol. 2003. V.69(5). P. 2928-2935.

60. Sessitsch A., Kan F.Y., Pfeifer U. Diversity and community structure of culturable *Bacillus* spp. populations in the rhizospheres of transgenic potatoes expressing the lytic peptide cecropin B // Appl. Soil Ecol. – 2003. – V. 22. – № 2. – P. 149-158.

61. Stackebrandt E., Pukall R., Ulrichs G., Rheims H. Analysis of 16S rDNA clone libraries: Part of the big picture // Methods of Microbial Community Analysis. – 1999. – P. 1-7.

62. Stahl D.A., Amann R. Development and application of nucleic acid probes// *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. 1991. Wiley, New York, N.Y. P. 205-248.

63. TanakaT., Fujiwara S., Nishikori S., Fukui T., Takagi M. and Imanaka T. A Unique Chitinase with Dual Active Sites and Triple Substrate Binding Sites from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. // Applied and Environmental Microbiol., 1999, V. 65, N. 12. P. 5338-5344.

64. Tebbe C.C., Vahjen W. Interference of humic acid and DNA extraction directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – V. 59. – № 8. – P. 2657-2665.

65. Theron J., Cloete T.E. Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity and Communiry Structure in Natural Environments // Critical Reviews in Microbiology. – 2000. – V. 26. – № 1. – P. 37-57.

66. Throback I.N., Johansson M., Rosenquist M., Pell M., Hansson M., Hallin S. Silver (Ag^+) reduces denitrification and induces enrichment of novel *nir*K genotypes in soil // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – V. 270. – P. 189-194.

67. Tolli J., King G. M. Diversity and structure of bacterial chemolithotrophic communities in pine forest and agroecosystem soils // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71. – № 12. – P. 8411-8418.

68. van Elsas J.D., Duarte G.F., Rosado A.S., Smalla K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment// J. Microbiol. Methods. 1998. V.32. P. 133-154.

69. Woese C.R. Bacterial Evolution // Microbiological Reviews. – 1987. – V. 51. – № 2. – P. 221-271.

70. http://www.pcr.ru/bibliogr/how_pcr/how_pcr.htm [pcr.ru] Кэри Б. Мюллис "Необычайная история о том, как родилась полимеразная цепная реакция " // В мире науки (Scientific American) Июнь N 6 1990 г.

71. http://www.bionet.nsc.ru/live/liveprint.php?f=doclad&p=shestakov С.В.Шестаков «Роль горизонтального переноса генов в эволюции»

Содержание

Введение **3**

Глава 1. Выделение ДНК (РНК) из биологического материала **5**

1.1. Выделение ДНК из почвенных образцов 7

1.2. Выделение ДНК из бактериальной биомассы 8

Глава 2. Амплификация фрагментов генетического материала **10**

2.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)..... 11

2.2. Стадии полимеразной цепной реакции 13

2.3. Праймеры 15

2.4. Разновидности ПЦР 16

2.5. Факторы, влияющие на точность молекулярных исследований…….. 19

2.6. Амплификация фрагментов гена 16S рРНК……..... 22

2.7. Методы определения наличия хитиназного гена
группы А у чистых культур микроорганизмов и в почве… 24

Глава 3. Анализ продуктов амплификации **25**

3.1. Электрофорез……... 25

3.1.1. Приготовление агарозного геля ……..... 26

3.1.2. Приготовление полиакриамидного геля ……..... 27

Глава 4. Оценка мониторинга микробных сообществ методами, основанными на использовании ПЦР **29**

Глава 5. Клонирование **33**

Глава 6. Идентификация метаболически активных клеток прокариот в почвах с применением молекулярно-биологического флюоресцентномикроскопического метода анализа fluorescence *in situ* hybridization (FISH)……..... 40

6.1. Отделение бактериальных клеток от элементов почвы…….. 40

6.2. Фиксация образцов клеток прокариот или почвенных экстрактов…… .41

6.3. Нанесение фиксированного образца на стекло……..... 42

6.4. Гибридизация фиксированных образцов с определенными зондами.... 43

6.5. Микроскопирование препаратов, приготовленных с использованием молекулярно-биологического метода (FISH)……..... 45

6.6. Оценка численности метаболически активных представителей доменов Archaea и Bacteria в почвах с хитином и без него при различных температурах…… 48

6.7. Идентификация отдельных метаболически активных филогенетических групп домена Bacteria, оценка их численности и биомассы в почвах……..... 50

Литература.....58

Учебное издание

Наталия Александровна Манучарова

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ПОЧВОВЕДЕНИИ И ЭКОЛОГИИ

Учебное пособие

Формат 60×84 $^{1}/_{16}$.
Бумага офсетная. Печать цифровая.
Тираж 100 экз. Заказ № Т-039-14.

Отпечатано с материалов, предоставленных автором,
в типографии «КДУ».
Тел./факс (495) 638-57-34;
www.kdu.ru; e-mail: press@kdu.ru