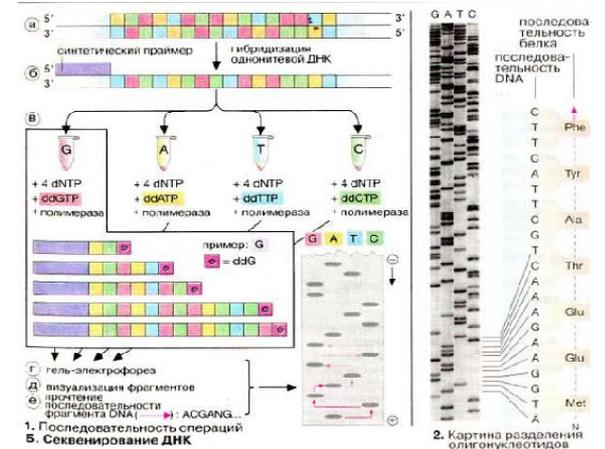
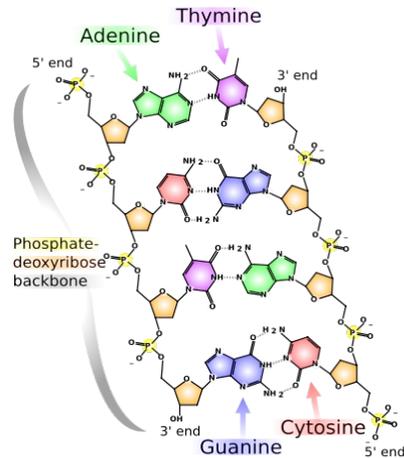
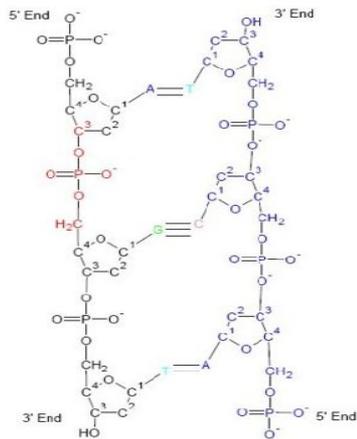


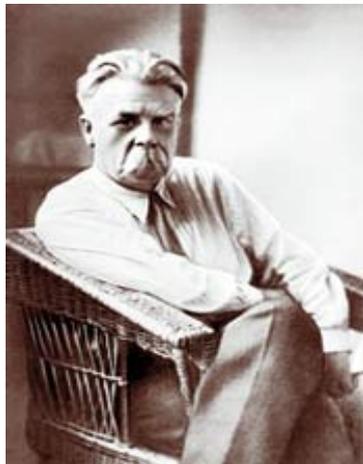
Ключевые методы молекулярной биологии. Секвенирование по Сенгеру

Докладчик: Шадрин Д.М.

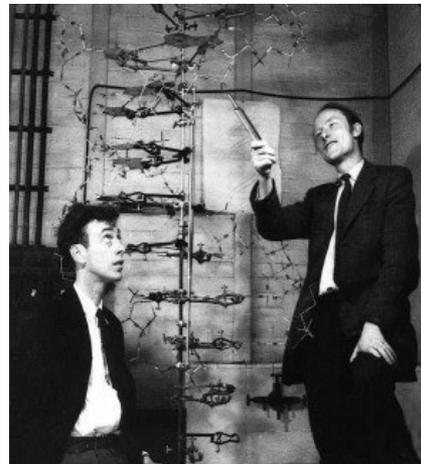
История разработки метода



Фридрих Мишер
Открытие ДНК
1869 год.



Николай Константинович
Кольцов
Структура ДНК,
1927 год



Джеймс Уотсон
и Френсис Крик
Двойная
спираль,
1953 год.



Фредерик Сенгер
Секвенирование ДНК,
1977 год



**Фредерих Сенгер,
родился в 1918 году
Дважды нобелевский
лауреат по химии
(1958, 1980).**

Сенгер использовал в своей работе меченые атомы, что позволило ему работать с ничтожно малым количеством экспериментального материала – порядка микрограммов.

В 1977 Сенгер и его коллеги продемонстрировали действенность своего метода, установив последовательность 5375 оснований в цепи ДНК бактериального вируса. Это был первый случай такой подробной расшифровки цепи ДНК. В журнале «Nature» им был опубликован полный список этой последовательности для нуклеотидов ДНК фага ФХ174, т.е. его химическая формула.

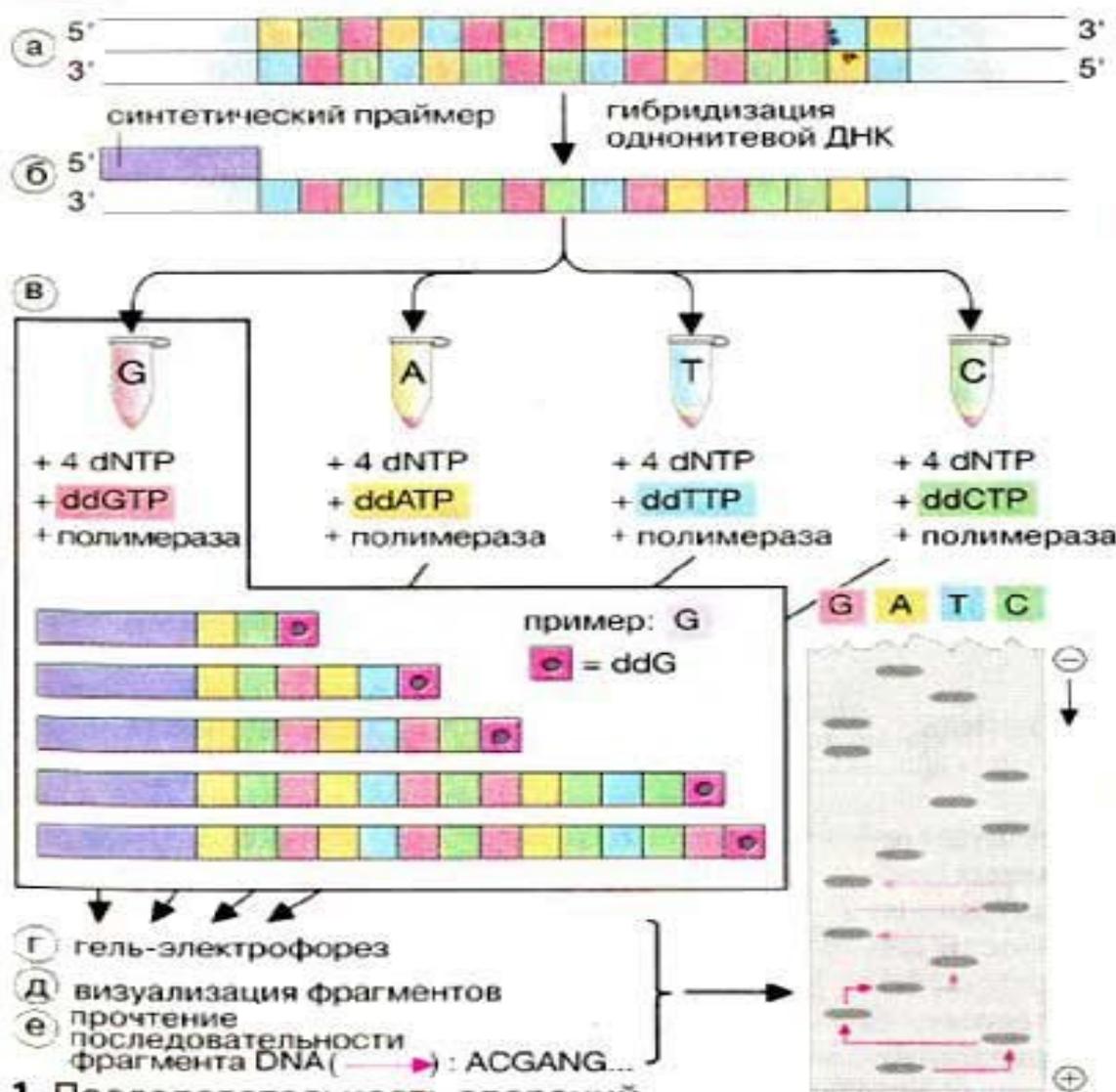
Публикации:

Sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. 1977. V. 74. (with A. R. Coulson, S. Nicklen); Nucleotide sequence of bacteriophage Phi X174 DNA // Nature. 1977. V. 265 (with others).

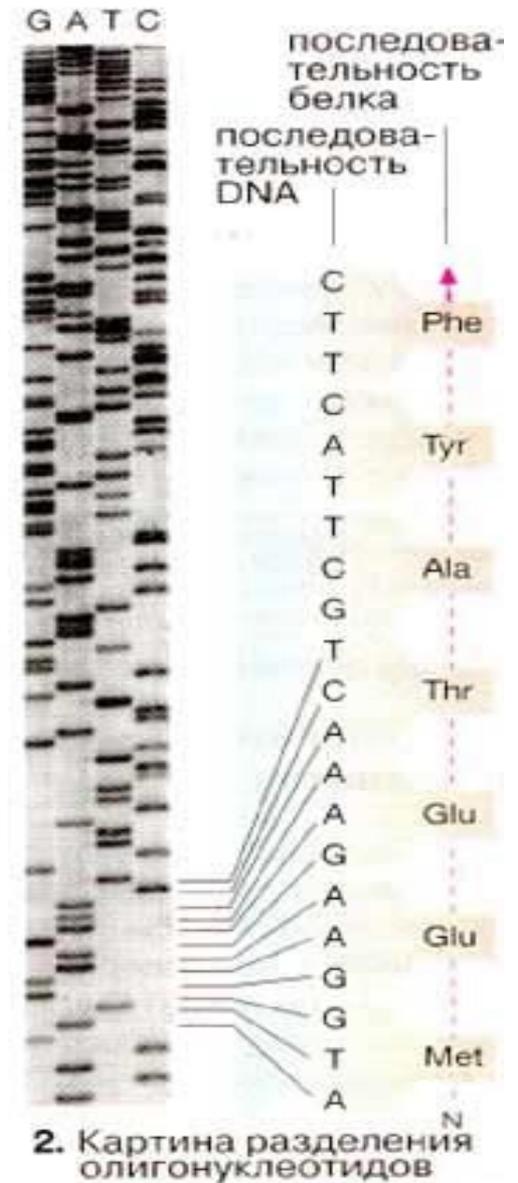
Основные понятия

- **Секвенирование** - представляет собой определение нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК путем получения серии комплементарных молекул ДНК, различающихся по длине на одно основание.
- **ДНК матрица** – последовательность ДНК, которую необходимо «прочитать» в ходе секвенирования (ПЦР продукт, плазмиды, различные участки геномов).
- **Праймер** (англ. *primer*) — это короткий фрагмент нуклеиновой кислоты, который служит стартовой точкой при репликации ДНК.
- **ДНК полимераза** – фермент, участвующий в синтезе дочерней молекулы ДНК, идущий на матрице родительской молекулы ДНК.
- **Терминатор** — нуклеотид, узнаваемый полимеразой как сигнал к прекращению синтеза комплементарной цепи на матрице ДНК.

Классический подход (Сенгер, 1977)



1. Последовательность операций
- Б. Секвенирование ДНК

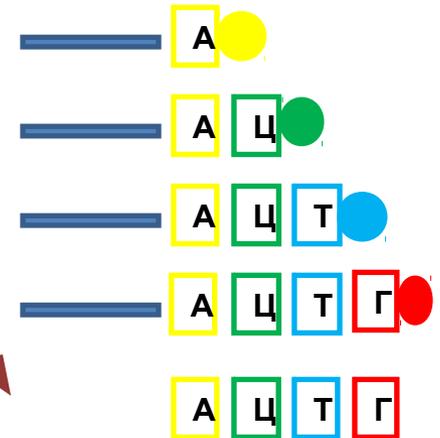
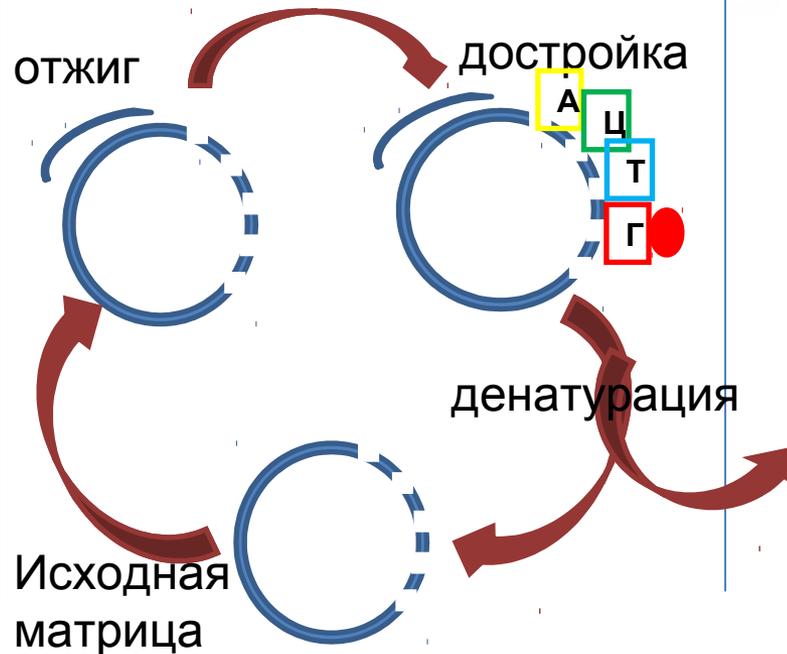
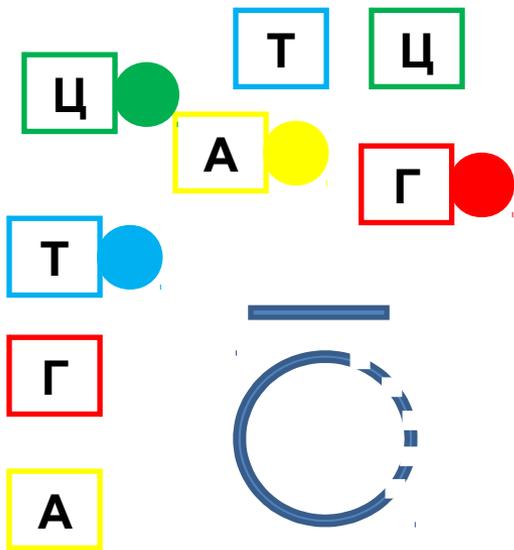


Секвенирование ДНК по Сенгеру

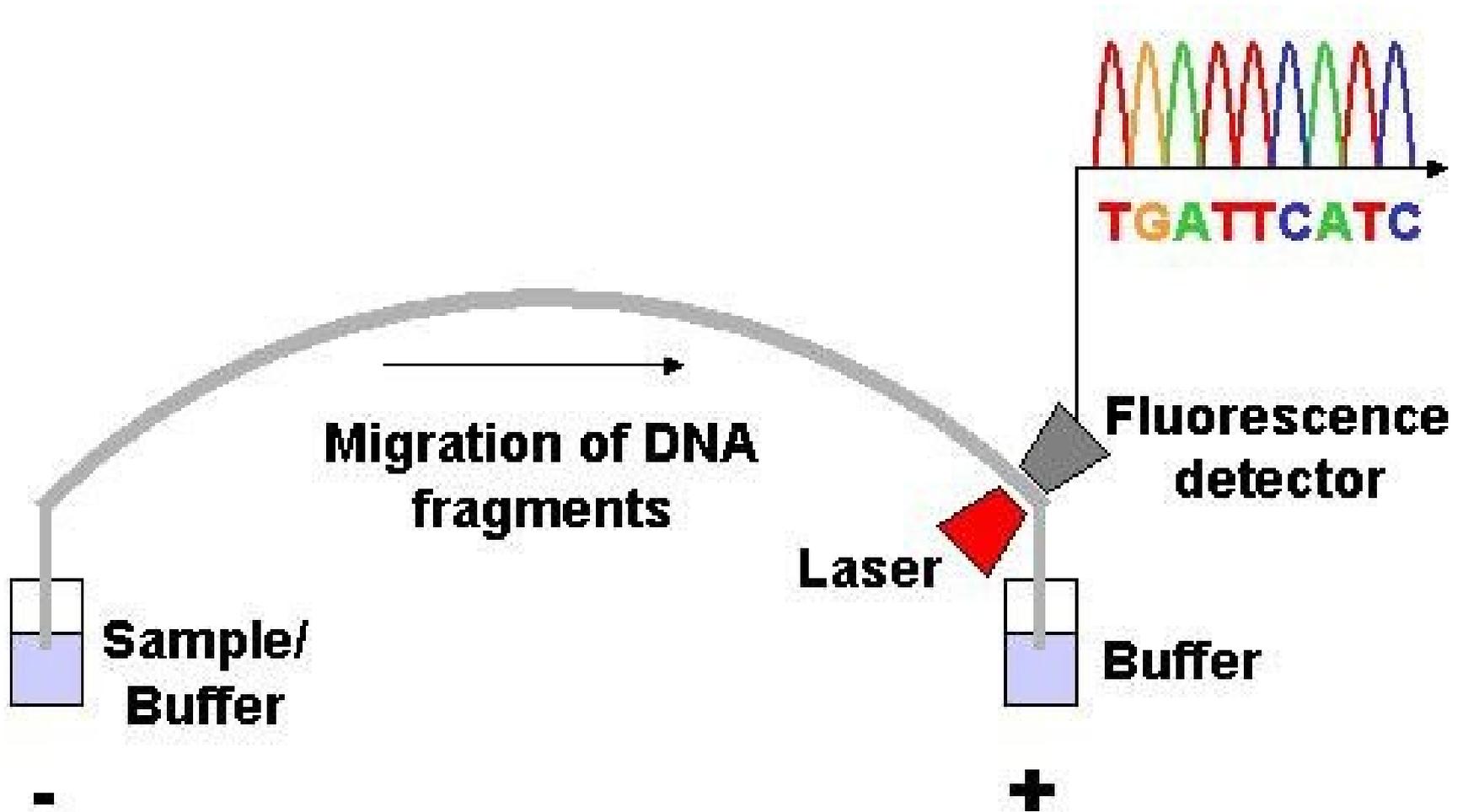
Реакционная смесь:
ДНК – матрица,
ДНК – полимераза,
Праймер,
Дезоксинуклеотиды,
Дидезоксинуклеотиды.



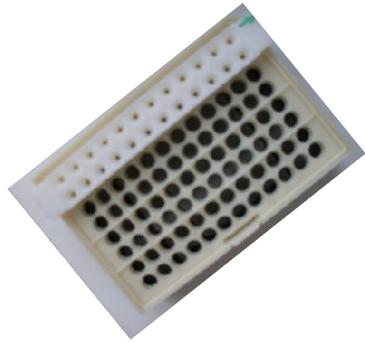
Термоциклирование



Секвенирование ДНК по Сенгеру



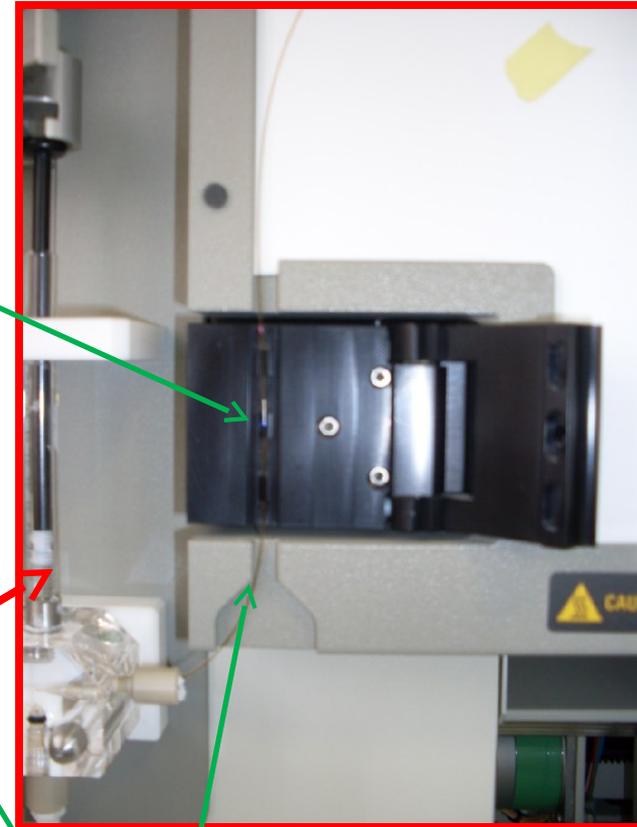
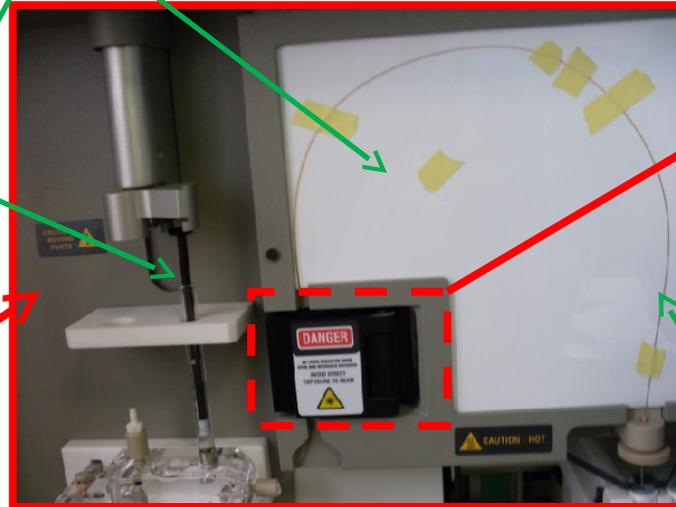
Устройство (принцип работы) секвенатора ABI 310



Окно детекции

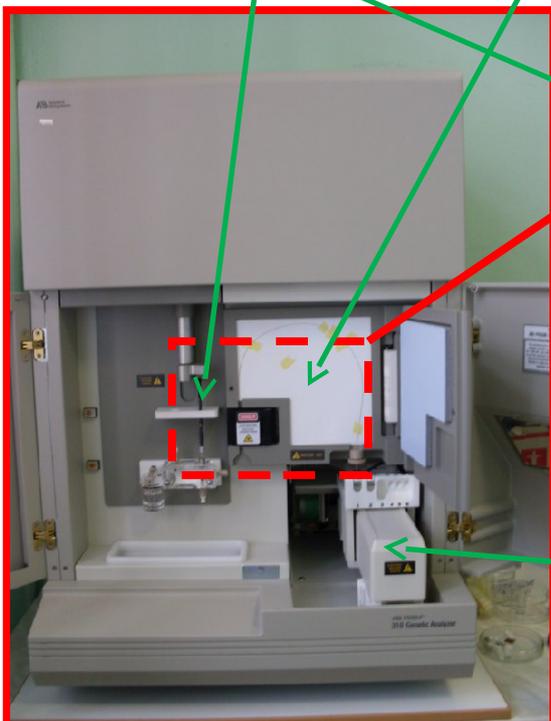
Термоблок

Шприц, заполненный полимером

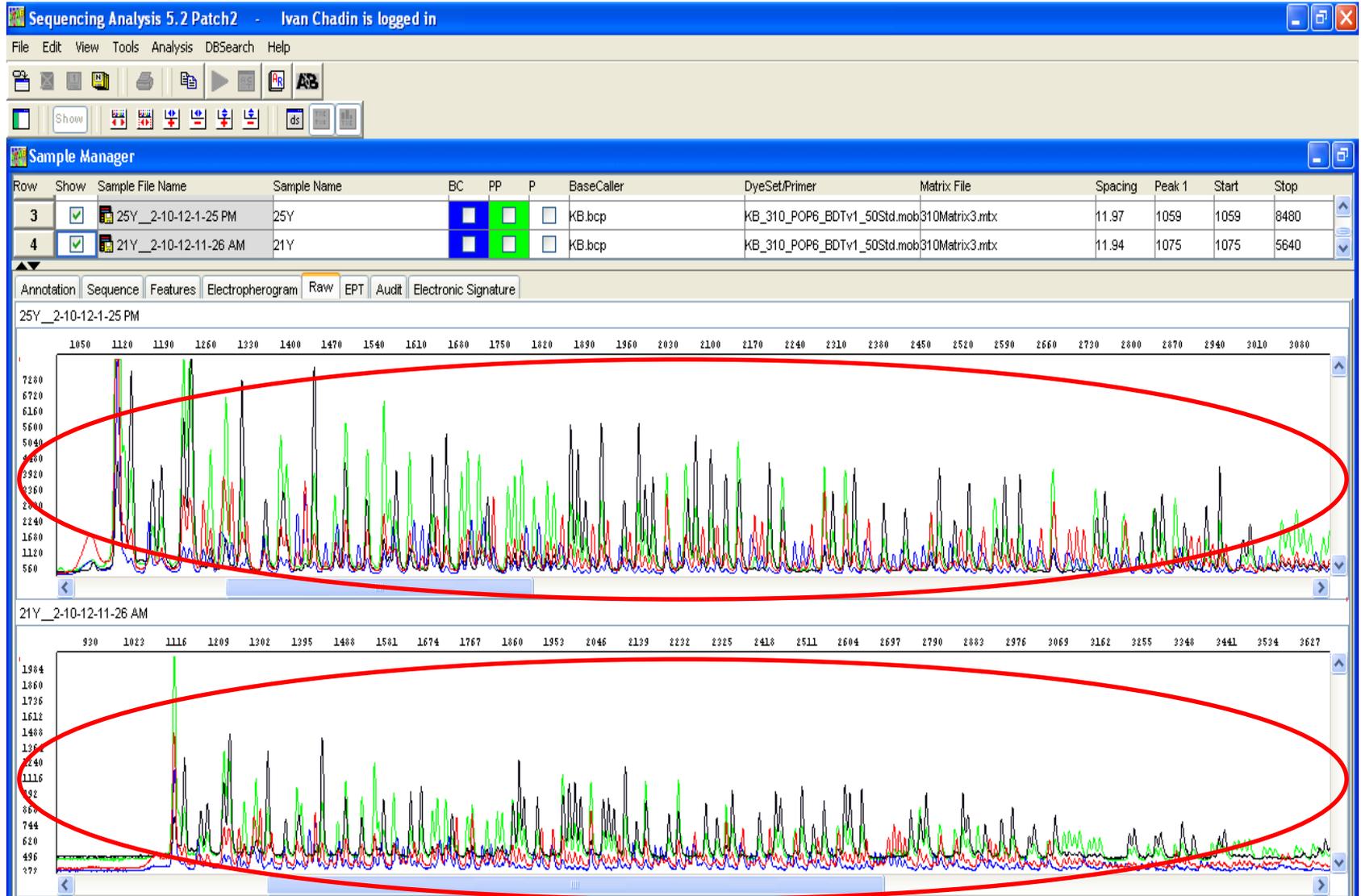


Капилляр
($d - 50 \text{ мкм}$, $L - 61 \text{ см}$)

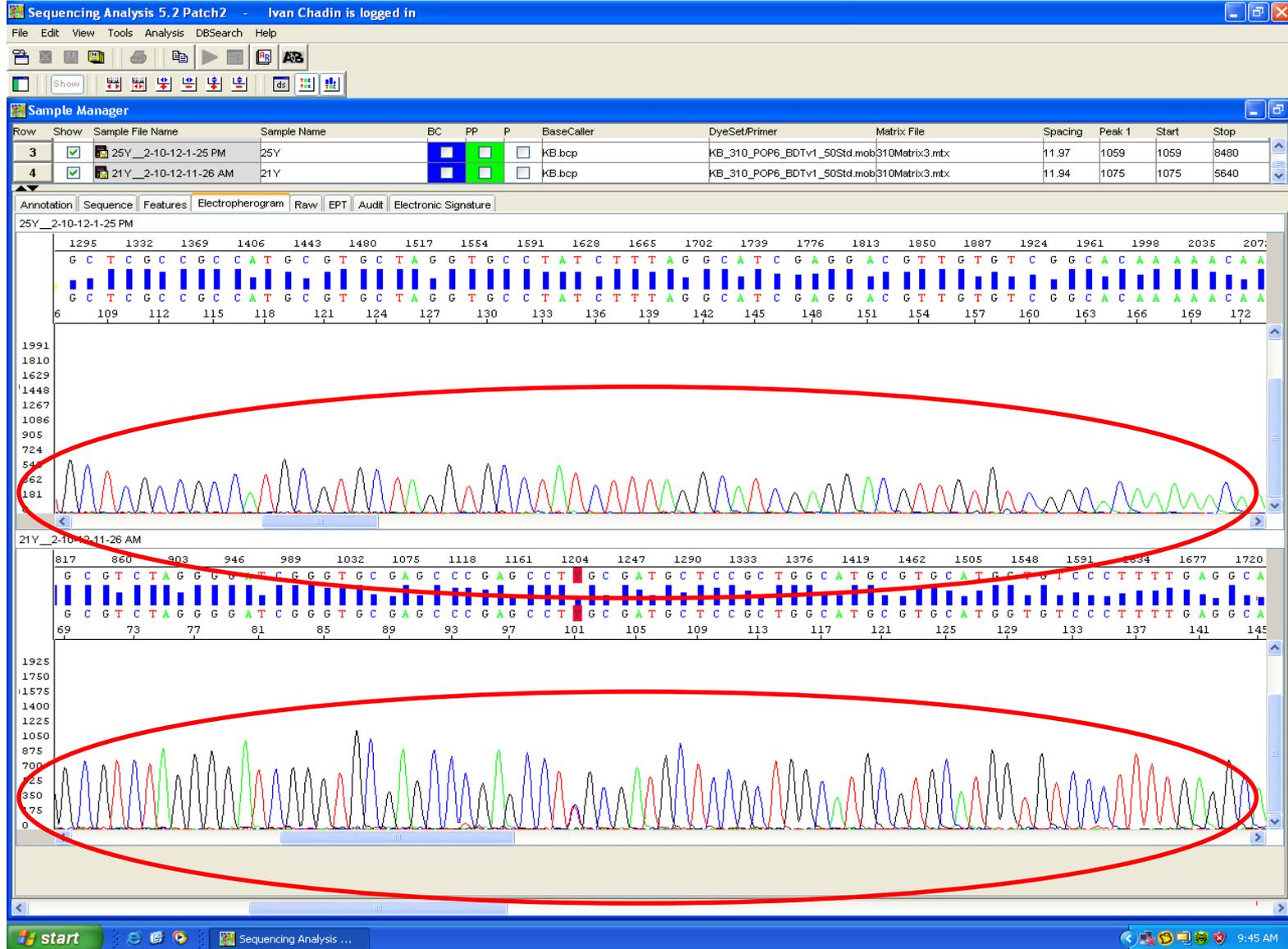
Автосемплер



«Сырые данные» (*Serratula manshurica* и *Saussurea grandifolia*) ITS последовательности рРНК.



Обработанные данные (*Serratula manshurica* и *Saussurea grandifolia*) ITS последовательности рРНК.



ITS последовательность рРНК растения *Saussurea grandifolia*

Sequencing Analysis 5.2 Patch2 - Ivan Chadin is logged in

File Edit View Tools Analysis DBSearch Help

Sample Manager

Row	Show	Sample File Name	Sample Name	BC	PP	P	BaseCaller	DyeSet/Primer	Matrix File	Spacing	Peak 1	Start	Stop
3	<input type="checkbox"/>	25Y_2-10-12-1-25 PM	25Y	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	KB.bcp	KB_310_POP6_BDTv1_50Std.mob310Matrix3.mtx		11.97	1059	1059	8480
4	<input type="checkbox"/>	21Y_2-10-12-11-26 AM	21Y	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	KB.bcp	KB_310_POP6_BDTv1_50Std.mob310Matrix3.mtx		11.94	1075	1075	5640

Annotation Sequence Features Electropherogram Raw EPT Audit Electronic Signature

1 NNNNNNNNNN NNNNNNNNMT ATANNNNCGAN TTCGANNMCG GTACCCGGGG NNCCTCTAGA GTCGACCTGC AGGCATGCAA GCTTGAGTAT TCTATAGTGT CACCTAAATA GCTTGGCGTA ATCATGGTCA 130

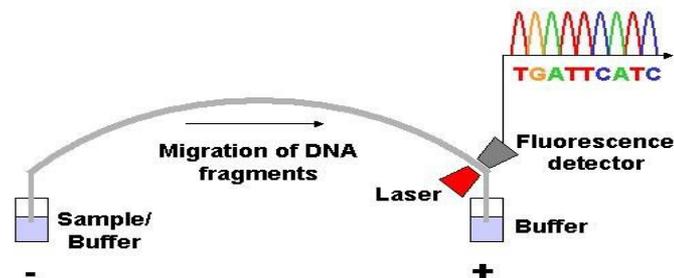
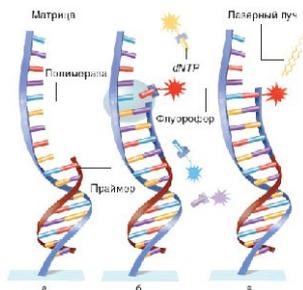
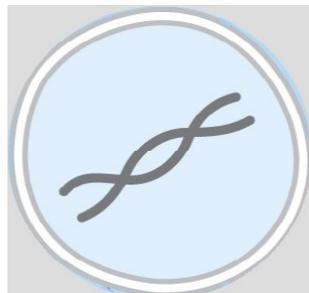
131 TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT GTAAAAGCCTG GGGTGCCCTAA TGAAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG CGCTCACTGC 260

261 CCGCTTTTCA GTCGGGAAAC CTGTCTGTGC AGCTGCATTA ATGAATCGGC CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT GGGCGCTCTT CCGCTTCCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTCGTTCC 390

391 GCTCGCGCGA GCGGTATCAG CTCACTCAAA GCGCGTAATA CGGTTATCCA CAGAATCAGG GGATAACGCA GAAAAGAACA TGTGAGCAAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCCGCGTTG 520

521 CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCT GACGAGCATC ACAAAAAATCG ACGCTCAAGT NMGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATMA AGATACCMGG CGTTTCCCCC TGGAAAGCTCC CTCGTGCGCT 650

Этапы подготовки и определения последовательности ДНК



Наработка матрицы НК для секвенсовой реакции

Экстракция НК из биологического материала

Дизайн (подбор) праймеров

ПЦР амплификация и последующая очистка продукта амплификации

Проведение секвенсовой реакции

Проведение секвенсовой реакции

Очистка продукта секвенсовой реакции

Капиллярный электрофорез

Электрокинетическая инъекция образца в капилляр

Электрофорез

Возбуждение/ детекция эмиссии флуоресценции (получение спектров эмиссии флуорофоров)

Смена полимерного материала в капилляре перед инъекцией следующего образца

Анализ данных

Компьютерная обработка данных

Факторы, влияющие на качество секвенсовой реакции

- Условие проведения реакции
- Качество реактивов используемых для секвенсовой реакции
- Качество наработанной матрицы НК для секвенсовой реакции
- Срок хранения наработанной матрицы

Обзор современных технологий Секвенирования

метод	По Сенгеру	Полупроводниково е Секвенирование	Лигирование олигонуклеотидов (SOLID™)	Illumina MiSeq
особенности	Длинные прочтения	Прочтения средней длины. Средняя производительность до млрд. п.н. за 2 ч. Количественные результаты	Млрд. коротких прочтений. Высокая производительность, до 180 млрд. за 2 нед. Количественные результаты	Млрд. коротких прочтений. Высокая производительность, до 180 млрд. за 2 нед. Количественные результаты
возможности	Ампликоны, Плазмиды.	Ампликоны, Небольшие участки геномов, Небольшие геномы.	Крупные участки геномов («экзом»), Полные геномы, Транскриптомы.	Крупные участки геномов («экзом»), Полные геномы, Транскриптомы.
ограничения	Небольшая производительность Тысячи п.н. в день.	Длина прочтений 400 п.н., трудно собрать геном богатый повторными последовательностями нуклеотидов	Длина прочтений 40 - 50 п.н., трудно собрать геном богатый повторными последовательностями нуклеотидов	Длина прочтений 40 - 50 п.н., трудно собрать геном богатый повторными последовательностями нуклеотидов

Круг решаемых задач (ABI Prism 310)



Ресеквенирование:

- Идентификация бактерий и ряда патогенных грибов;
- Выявление и подтверждение мутаций;
- Выявление и подтверждение гетерозиготности;
- Выявление и подтверждение SNPs;
- Сравнительное секвенирование;

Генотипирование (HLA-типирование; Генотипирование ВИЧ для идентификации мутаций устойчивости к лекарственным препаратам).

Секвенирование De novo - расшифровка абсолютно неизвестных последовательностей ДНК.

Фрагментный анализ - AFLP-анализ

Круг решаемых задач (ABI Prism 310)

- Филогенетический анализ

Molecular Phylogenetics and Evolution 62 (2012) 263–274

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular Phylogenetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ympev



Phylogeny, diversification rates and species boundaries of Mesoamerican firs (*Abies*, Pinaceae) in a genus-wide context

Érika Aguirre-Planter^{a,1}, Juan P. Jaramillo-Correa^{a,b,1}, Sandra Gómez-Acevedo^a, Damase P. Khasa^b, Jean Bousquet^b, Luis E. Eguiarte^{a,*}

^a Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, México, D.F., México; ^b Canada Research Chair in Forest and Environmental Genomics, Centre for Forest Research and Institute for Systems and Integrative Biology, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 May 2011
Revised 26 September 2011
Accepted 28 September 2011
Available online 10 October 2011

Keywords:
Biogeography
Chloroplast DNA
Conifer
Mexico
Transverse Volcanic Belt
Molecular phylogeny
Diversification rates

ABSTRACT

The genus *Abies* is distributed discontinuously in the temperate and subtropical montane forests of northern hemisphere. In Mesoamerica (Mexico and northern Central America), modern firs originate from the divergence of isolated mountain populations of migrating North American taxa. However, the number of ancestral species, migratory waves and diversification speed of these taxa is unknown. I number of ancestral species, migratory waves and diversification speed of these taxa is unknown. I variation in repetitive (P30204, P63718, and P71936) and non-repetitive (rbcL, rps18-rp20 and trnF) regions of the chloroplast genome was used to reconstruct the phylogenetic relationships of Mesoamerican *Abies* in a genus-wide context. These phylogenies and two fossil-calibrated scenarios further employed to estimate divergence dates and diversification rates within the genus, and to test hypothesis that, as in many angiosperms, conifers may exhibit accelerated speciation rates in the tropics. All phylogenies showed five main clusters that mostly agreed with the currently recognized taxa of *Abies* and with the geographic distribution of species. The Mesoamerican taxa formed a group with species from southwestern North America of sections *Diamel* and *Grandis*. However, divergences of the same species were not monophyletic within this group. Divergence of this whole group back to the late Paleocene and the early Miocene depending on the calibration used, which trans very low diversification rates ($\tau_{0.0} = 0.026-0.054$, $\tau_{0.5} = 0.009-0.019$ sp/Ma). Such low rates were constant along the entire genus, including both the subtropical and temperate taxa. An extended geographic analysis on the Mesoamerican clade indicated that *Abies flinckii* and *A. concolor* were divergent taxa, while the remaining species (*A. durangensis*, *A. guatemalensis*, *A. hickelii*, *A. religiosa*, *A. vejarii*) formed a single group. Altogether, these results show that divergence of Mesoamerican species with a model of environmental stasis and decreased extinction rate, being probably pronounced series of range expansions and isolation-by-distance.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Acta Tropica 120 (2011) 1–14

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Review Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): The foundation for molecular systematics and phylogenetic research

Ralph E. Harbach*
Department of Entomology, Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD, UK

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 April 2011
Received in revised form 4 June 2011
Accepted 21 June 2011
Available online 29 June 2011

Keywords:
Culex
Infrasubgeneric categories
Systematics
Taxonomy

ABSTRACT

The internal classification of the cosmopolitan and medically important genus *Culex* is thoroughly reviewed and updated to reflect the multitude of taxonomic changes and concepts which have been included since the classification was last compiled by Edwards in 1932. Both formal and informal taxa are included. The classification is intended to aid researchers and students who are interested in analyzing species relationships, making group comparisons and testing phylogenetic hypotheses. The genus includes 768 formally recognized species divided among 26 subgenera. Many of the subgenera are subdivided hierarchically into nested informal groups of morphologically similar species that are believed to represent monophyletic lineages based on morphological similarity. The informal groupings proposed by researchers include Sections, Series, Groups, Lines, Subgroups and Complexes, which are unlikely to be phylogenetically equivalent categories among the various subgenera.

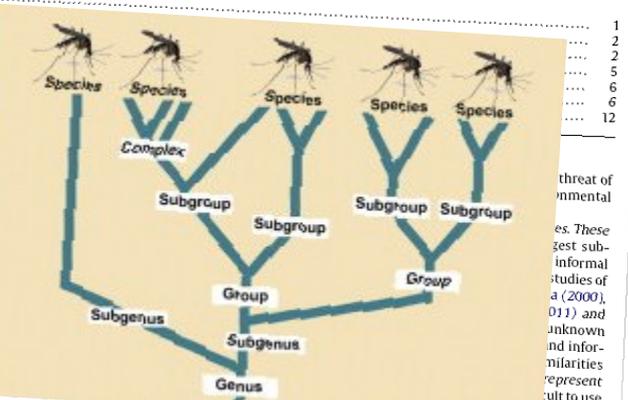
© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	1
2. Explanation and procedures	2
3. Taxonomic history	2
4. Discussion	5
5. Conclusions	6
6. Classification of genus <i>Culex</i>	6
References	12

1. Introduction

Mosquitoes, family Culicidae, are segregated into 11 tribes (Harbach et al., 2002). Tribe Culicini is the largest and most diverse of the tribes (about 25% of all known species). It includes four genera: *Culex* Linnaeus (cosmopolitan), *Galmomyia* Stone (Neotropical), *Lutzia* Theobald (absent from the Neotropical Regions). Adult females of many species of subgenera *Culex* are important vectors of encephalitis.



* Corresponding author. Tel.: +44 20 7942 5768; fax: +44 20 7942 5229. E-mail address: r.harbach@nhm.ac.uk

Круг решаемых задач (ABI Prism 310)

- Исследование генетического разнообразия популяций некоторых редких реликтовых или хозяйственно ценных видов растений и ЖИВОТНЫ

Biochemical Systematics and Ecology 39 (2011) 297–301



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Biochemical Systematics and Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochemsyseco



Genetic diversity within and among populations of *Neopicrorhiza scrophulariiflora* (Scrophulariaceae) in China, an endangered medicinal plant

Xiao-Li Liu^{a,b}, Zi-Gang Qian^b, Fei-Hu Liu^{a,*}, Yao-Wen Yang^b, Chun-Xia Pu^b

^a College of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, PR China

^b Department of Traditional Chinese Pharmacy, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650200, PR China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 October 2010

Accepted 6 March 2011

Available online 21 September 2011

Keywords:

Neopicrorhiza scrophulariiflora

Endangered medicinal plant

Genetic diversity

Population structure

ISSR

ABSTRACT

Neopicrorhiza scrophulariiflora Pennel (Hong) (Scrophulariaceae) is an endangered medicinal plant, endemic to the Eastern Himalayas and the Hengduan Mountains. Levels of genetic variation and genetic structure of seven populations of *N. scrophulariiflora* in China were studied using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Thirteen primers amplified 82 total loci from 7 populations composed of 136 individuals. All 82 loci were polymorphic, showing a percentage of polymorphic bands (PPB) of 100%, indicating considerable genetic variation at the species level. In contrast, a low level of genetic diversity within populations was detected with a mean PPB of 30.56%. In addition, Nei's genetic diversity analysis (0.4073) and Shannon's diversity index (0.5917) revealed similar genetic structure. High levels of genetic differentiation ($G_{st} = 0.6955$) and restricted gene flow ($N_m = 0.2198$) among populations were also detected. Anthropologic impacts, together with clonal propagation, genetic drift and geographical isolation might be the reasons which had shaped the genetic structure of this species.

© 2011 Published by Elsevier Ltd.

Круг решаемых задач (ABI Prism 310)

- Проведение молекулярно-генетической паспортизации растений с целью идентификации их генофонда и оптимизации их генетического разнообразия.

Journal of the Science of Food and Agriculture

J Sci Food Agric 88:733–737 (2008)



Relative efficiency of DNA markers (RAPD, ISSR and AFLP) in detecting genetic diversity of bitter gourd (*Momordica charantia* L.)

Tusar K Behera,^{1,2*} Ambika B Gaikward,³ Anand K Singh⁴ and Jack E Staub²

¹Division of Vegetable Science, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi 110012, India

²USDA Vegetable Crops Unit, Department of Horticulture, 1575 Linden Drive, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA

³National Research Centre on DNA Fingerprinting, National Bureau of Plant Genetic Resources, Pusa Campus, New Delhi 110012, India

⁴Division of Fruits and Horticulture Technology, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi 110012, India

Abstract

BACKGROUND: Bitter gourd (*Momordica charantia* L.) is an important vegetable crop in tropical countries, including China and India. A wide range of genetic diversity exists in India with respect to fruit morphology such as colour, size and exocarp. A diversity assessment conducted using different DNA marker systems amplified fragment length polymorphism (AFLP), inter simple sequence repeat (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers) will be helpful in the establishment of a broad-based description for improved germplasm curation and the identification of germplasm for genome mapping and breeding of bitter gourd.

Круг решаемых задач (ABI Prism 310)

- Генотипирование бактерий на основе секвенирования с целью видовой идентификации штаммов.

Molecular typing of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. strains, isolated in the Russian Federation

O.L. Voronina^{1,2}, M.S. Kunda¹, V.G. Lunin¹, T.I. Karpova¹, I.S. Tartakovskiy¹

¹ N.F. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology, RAMS, Moscow, Russia

² A.N.Bakh Institute of Biochemistry, Moscow, Russia

On the base of international standards of molecular-genetic typing (SBT protocol and EQA scheme using DNA sequencing of the *mip*-gene of the European Working Group for Legionella Infections – EWGLI) were described the strains of *Legionella pneumophila* and *Legionella* species, isolated in the Russian Federation during the last years at the monitoring and at the epidemic outbreak, and strains, presented in Gamaleya Institute Collection of Legionellosis (GICL). It was determined that 31 new strains from 3 Russian Federation's regions belonged to

19 allelic profiles. It was revealed, that profiles 1, 4, 3, 1, 1, 6 и 6, 10, 19, 28, 19, 4, 3 were most abundant among the native strains. 9 new allelic profiles were identified, which were not earlier submitted in EWGLI base. On the base of EQA scheme using DNA sequencing of the *mip*-gene the species identification of three new *Legionella*'s strains were made: 2 - *L. gratiana* и 1 - *L. gormanii*. The identified strains were not tested in R F's territory earlier.

Key words: SBT and EQA protocols of EWGLI, legionellosis, *Legionella pneumophila*, *Legionella* spp., strains allelic profile.

Оборудование и реактивы, необходимые для проведения секвенирования

Оборудование:

- Секвенатор,
- Амплификатор,
- Автоклав,
- Источник бесперебойного питания - 2,
- Ламинарный шкаф (ПЦР бокс),
- Прибор для измерения концентрации нуклеиновых кислот (Qubit /Пикодроп),
- Центрифуга - 15тыс об./сек,
- Твердотельный термостат,
- Вортекс/Шейкер,
- Камера для горизонтального электрофореза + источник питания,
- Трансиллюминатор,
- Дозирующие устройства.

Реактивы:

- Реактивы для экстракции НК из биологического материала
- Компоненты реакционной смеси для проведения ПЦР-реакции: праймеры, полимеразы, буфер, нуклеотиды, деионизированная вода без нуклеаз.
- Реагенты для проведения горизонтального электрофореза в агарозном геле.
- Набор для очистки продукта амплификации из агарозного геля
- Реактивы для проведения секвенсировочной реакции и очистки ее продукта.

Расходные материалы:

- Большое количество «пластика» (наконечники на дозаторы, пробирки типа Эппендорф разного объема, септы, стрипы, и т.п.)

Задачи, которые можно решать с использованием технологий полногеномного секвенирования

Геномика. Научные результаты

Секвенирование метагенома микробных сообществ донных отложений озера Кротовья Ляга

Е.С. Кострюкова¹, С.А. Левшицкий¹, О.В. Селезнева², М.М. Чукин², А.К. Ларин², И.Г. Кондратов², В.Н. Лазарев², А.С. Розанов², А.В. Брянская¹, С.Е. Пельтек¹, В.М. Говорун^{2,4,5}, В.А. Иванисенко¹, П.С. Деменков², С.С. Пянтус², Т.В. Иванисенко¹, Н.А. Поболонный¹, А.Н. Иванисенко¹, Н.А. Колманов¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

² НИИ физико-химической медицины, Москва

³ Институт вычислительной математики и математической геофизики СО РАН, Новосибирск

⁴ РНЦ «Курчатовский институт», Москва

⁵ Институт биоорганической химии РАН, Москва

Проведено секвенирование метагенома микробных сообществ донных отложений озера Кротовья Ляга, расположенного в Новосибирской области. Характерной особенностью данного озера является ускоренный распад органических отложений растительного происхождения, что может определяться активностью микробных сообществ.

Образцы материала были отобраны на границе тростника и зеркала озера с глубины 60 см в илстых отложениях, образованных остатками водорослей и вышних растений, представляющих собой полужидкую массу, располагающуюся на глубине до 120 см от поверхности озера.

Из проб озера выделяли образцы ДНК, на основе которых получали библиотеку фрагментов с помощью набора TOPO® Shotgun Subcloning Kit (Invitrogen, США) с размером фрагментов 2000 пар нуклеотидов. Полученными плазмидными векторами трансформировали клетки *E. coli* посредством электропорации. Нуклеотидную последовательность рекомбинантных

клонов определяли с использованием набора для термодинамического секвенирования Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem, США). Продукты реакции анализировали с использованием автоматического секвенатора ABI Prism Genetic Analyzer 3730XL (Applied Biosystem, США, Hitachi, Япония).

На текущий момент библиотека прочитана в размере 8000 образцов с помощью секвенирования по методу Сэнгера с детекцией результатов в режиме капиллярного электрофореза. Подготовлена и прочитана фрагментная библиотека в формате полтора полных слайдов генетической платформы SOLiD™ 4 System (Applied Biosystems). При использовании этой технологии было прочитано около 3 млрд коротких нуклеотидных последовательностей. В ходе дальнейшего анализа в числе прочих значимых результатов в геномном составе анализируемого образца обнаружено значительное количество и разнообразие генов, кодирующих различные ферменты в составе метаболических путей деградации биополимеров, в том числе семейства целлюлаз.



Рис. Озеро Кротовья Ляга (Новосибирская область), из которого были взяты образцы для секвенирования метагенома.

Задачи, которые можно решать с использованием технологий полногеномного секвенирования

Метагеномный анализ альго-бактериальных сообществ

Ю.Р. Захарова¹, Ю.П. Галавьянц¹, М.И. Курилкина¹, А.В. Лиховица¹, С.М. Шишляников¹, Д.П. Петрова¹, О.В. Калужная¹, К.В. Хабудая¹, А.В. Марданов¹, А.В. Белецкий², Н.В. Равин², Е.В. Лиховица¹

¹ Димнологический институт СО РАН, Иркутск

² Центр «Биоинженерия» РАН, Москва

С целью выявления микроорганизмов, потенциально участвующих в круговороте Si в оз. Байкал, сформированы альго-бактериальные сообщества из полученной в результате выполнения проекта аксеничной культуры диатомовой водоросли *Synedra acus* subsp. *radians* (Kutz.) Skabitsch, и микроорганизмов, изолированных из придонной глубинной воды озера. Для 7 штаммов: *Mycoplana bullata*, *Sphingomonas rhizogenes*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus simplex*, *Acinetobacter johnsonii*, *Methylobacterium adhaesivum* и *Dienococcus aquaticus*, которые идентифицированы по фенотипическим свойствам и результатам анализа генов 16S рРНК, экспериментально выявлены различия в степени воздействия на рост культуры диатомей. Максимальным воздействием обладали штаммы *Mycoplana bullata*, *Methylobacterium adhaesivum*, *Sphingomonas rhizogenes* и *Dienococcus aquaticus*, что выразилось в угнетении роста диатомей с последующим разрушением кремнистых панцирей водорослей. Анализ данных, полученных при широкосеквенировании shotgun-библиотек метагеномной ДНК, выделенной из различных образцов экспериментально полученных альго-бактериальных сообществ, выявил высокую гетерогенность таксономического состава микроорганизмов. В составе метагеном определены фрагменты генов 16S РНК представителей 60 семейств из 6 известных филумов эубактерий. В образцах альго-бактериальных сообществ установлены различия в таксономическом составе микробных сообществ на уровне субфилумов и классов эубактерий. При анализе метагеномных данных впервые для пресноводных альго-бакте-

риальных сообществ выявлены последовательности профагов, доминирующими группами являются Siphoviridae, Podoviridae и Myoviridae. Изменению состава доминирующих групп микроорганизмов в альго-бактериальных сообществах сопутствовало изменение состава профагов. Использование рекрумент-анализа в авторской интерпретации позволило установить, что в длительно существующем альго-бактериальном сообществе доминируют микроорганизмы, родственные штаммам SBW25 и Pf0-1 *Pseudomonas fluorescens* (рис.), выявленные ранее в почве, а также в околоризобальном окружении и на листьях растений. Согласно литературным данным, указанные штаммы *P. fluorescens* обеспечивают стабильность и иммунитет растений к воздействию других микроорганизмов.

Таким образом, метагеномный анализ таксономического состава природного бактериального сообщества из придонной глубоководной пробы с применением широкосеквенирования выявил его сложную структуру с доминированием представителей филумов Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria и Verrucomicrobia и существенно расширил представление о разнообразии микроорганизмов оз. Байкал.

В ближайшей перспективе планируется проведение расшифровки геномов наиболее активных штаммов бактерий с целью выявления генов и ферментов, обеспечивающих деградацию диатомей, а также метагеномный анализ альго-бактериальных сообществ из водной толщи и донных осадков для выявления новых факторов, участвующих в круговороте кремния в оз. Байкал.

Работа выполнялась при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ 09-04-12231-офи_м.

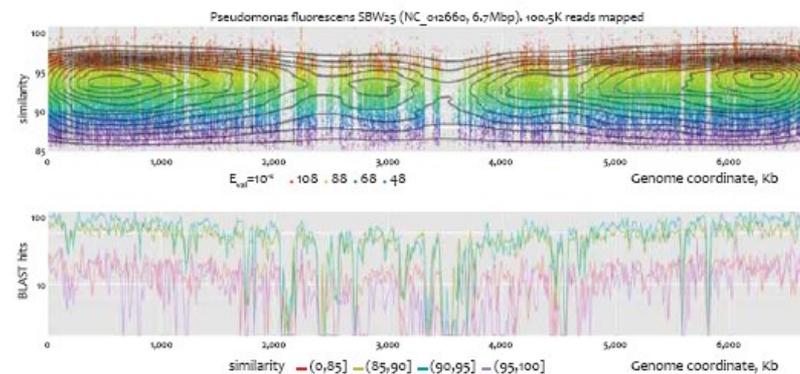


Рис. Рекрумент-график, полученный при картировании метагеномных чтений из образца А на полногеномную последовательность *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Рекрумент-график состоит из двух дорожек с общей осью абсцисс. На верхней дорожке осью ординат является сходство референсной геномной и сравниваемой метагеномной последовательностей. Цвет точек на верхней дорожке показывает значение e-value для найденных BLAST-совпадений. Темные изолинии на верхнем графике вычислены согласно плотности точек на плоскости, формируемой осями абсцисс и ординат. На нижней дорожке в качестве оси ординат служит количество BLAST-совпадений, находящихся в пределах скользящего окна размером 15 тыс. пар оснований относительно текущей позиции референсного генома для чтений, которые попадают в соответствующие интервалы сходства с референсной последовательностью.

Задачи, которые можно решать с использованием технологий полногеномного секвенирования

Изучение структуры микробных сообществ в гидратсодержащих осадках озера Байкал с использованием метода пиросеквенирования

Т.И. Земская¹, Н.В. Разин¹, О. Шубенкова¹, А. Ломакина¹, С. Максименко¹, В. Кадников¹, А. Марданов², А. Белетский²

¹Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

²Центр «Биоинженерия» РАН, Москва

Цель: исследовать структуру микробных сообществ в трех образцах из района грязевого вулкана «Санкт-Петербург» с использованием метагеномного анализа.

Задачи исследования: методом пиросеквенирования получить наборы чтений V3 области гена 16S рРНК трех метагеномных образцов ДНК и установить их таксономическую принадлежность; оценить соотношение доменов Archaea и Bacteria в исследуемых образцах; на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S rRNA и метил-коэнзим М редуктазы (*McrA*) оценить функциональную роль микробных сообществ в исследуемых образцах.

Установлено, что в придонной области археи составляют около 1%, в поверхностном слое осадка – 60% и в восстановленном осадке, прилегающем к слою ГГ, – 27% (рис.).

В ДНК из придонной области около 50% принадлежит метанотрофным бактериям, осуществляющим аэробное окисление метана и относящимся к классам гамма- и бета-протеобактерий. Среди гамма-протеобактерий 85% составляют представители рода *Methylobacter*, широко распространенные в холодноводных экосистемах. 11% синхенов принадлежит семейству *Thiotrichaceae*, из которых около 5% идентифицируются как бесцветные серные бактерии рода *Thiotrix*. Другой репрезентативной группой в микробном сообществе придонной области являются бета-протеобактерии, типичные водные организмы, 83% которых относятся к семейству *Comamonadaceae* и 7% – к семейству *Methylophilaceae*. Дельта-протеобактерии насчитывают около 6%, сульфатредукторы составляют небольшую часть в бактериальном сообществе.

В ДНК поверхностного осадка обнаружены последовательности гамма- и бета-протеобактерий, аналогичные отмечаемым в ДНК из придонной области.

Второй основной группой в ДНК поверхностного слоя осадка являются цианобактерии, которые составляют 20%. Их морфология, наличие внутриклеточных структур свидетельствуют о том, что эти микроорганизмы активно размножаются на глубинах более 1 км. Кроме того, в ДНК поверхностных осадков обнаружены представители филумов Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Chloroflexi, Spirochaetes, Caldiseica, JS1, Verrucomicrobia, а также неклассифицированные последовательности. В ДНК глубоководных осадков, кроме того, отмечены обитатели морских осадков, представители группы JS1, метаболизм которых практически не известен. В поверхностных осадках 1/3 архей принадлежит метаногенам, семейств Methanomicrobiales и Methanosarcinales. Также обнаружены представители филумов TMEG, MGIII, MCG, Thermoplasmatales, имеющих культивируемых представителей и обитающих в наземных и водных экосистемах. Впервые установлено, что более 1/3 архей принадлежит новым филумам, у которых нет культивируемых представителей.

Для выяснения функциональной роли выявленных групп были проведены исследования последовательностей нуклеотидов генов 16S rRNA и метил-коэнзим М редуктазы (*McrA*), которые были сопоставлены со структурами генов известных метаногенов и анаэробных метанотрофов. Проведенный филогенетический анализ показал, что во всех случаях полученные последовательности кластеризуются с метаногенами и не образуют кластеров с известными анаэробными окислителями метана. Эти данные согласуются с геохимическими обстановками, регистрируемыми в данном районе.

Таким образом, применение метагеномного анализа позволило выявить присутствие только оз. Байкал филум архей и установить отсутствие представителей групп ANME, ответственных за анаэробное окисление метана в морских осадках.

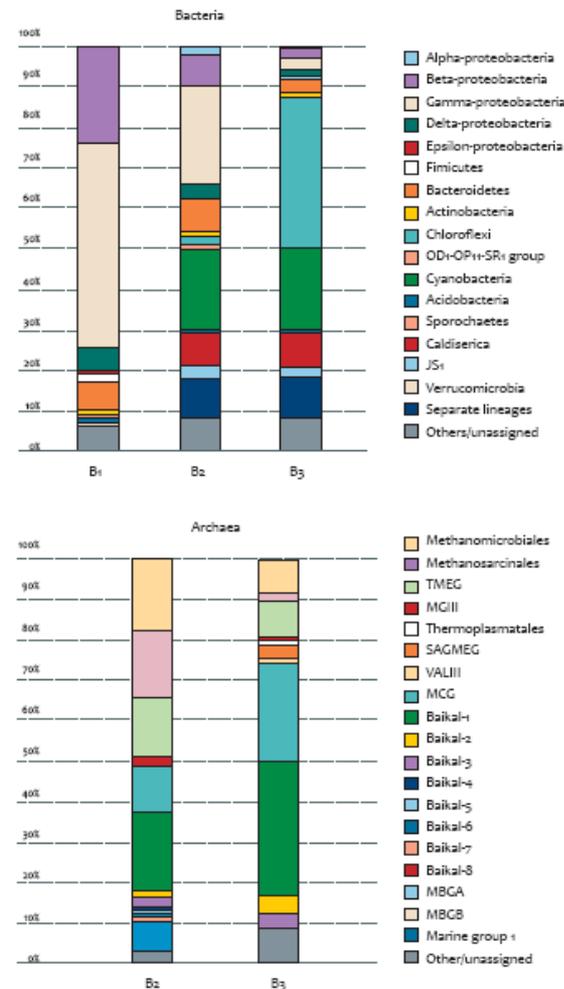


Рис. Филогенетическая структура микробных сообществ в придонном слое воды (B1), поверхностном слое осадка (B2) и слое осадка, прилегающем к гидрату метана (B3).

Задачи, которые можно решать с использованием технологий полногеномного секвенирования

Обнаружение закономерных связей между строением генома и биологическими свойствами штаммов вируса клещевого энцефалита посредством секвенирования и анализа полноразмерных геномов

В.В. Потапов, У.В. Потапова, И.Г. Кондратов, Н.Н. Деникина, С.И. Беликов
Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

Целью настоящей работы является поиск мутаций в геноме вируса клещевого энцефалита (КЭ), влияющих на изменение патогенности штаммов для человека.

Известно, что варианты вируса КЭ, циркулирующие в лесной зоне России и сопредельных стран, подразделяются на генетическом уровне на три субтипа: дальневосточный, сибирский и европейский, причем каждый субтип вируса вызывает различную тяжесть заболевания. Из статистических данных следует, что дальневосточный субтип вируса наиболее часто вызывает тяжелые случаи заболевания, приводящие к летальному исходу или инвалидности. Сибирский субтип вируса часто вызывает менингеальную форму заболевания. Однако однозначной связи между субтипами вируса и патогенностью не выявлено, среди отдельных субтипов имеются штаммы, вызывающие весь спектр тяжести заболевания. Отсутствие достоверных точных данных о связи особенностей генома (мутациями) вируса и его патогенностью не позволяет ни делать прогноз заболевания на ранней стадии инфицирования, ни оценивать территории по степени опасности.

Нами определены нуклеотидные последовательности 36 штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа, вызвавших диаметрально противоположную тяжесть заболевания. 10 штаммов вызвали очаговую форму заболевания с летальным исходом, остальные штаммы выделены от «курильных» клещей пациентов с субклинической формой заболевания. Далее первую группу штаммов мы будем условно называть «вирулентными», а вторую группу – «инаппарантными».

Показано, что инаппарантные штаммы имеют характерные мутации, однозначно отличающие их от вирулентных штаммов, причем наибольшее количество мутаций имеется в генах неструктурных вирусных белков. Группоспецифичные мутации приводят к заменам 16 аминокислотных остатков в полипротеине вируса, причем наибольшее количе-

ство аминокислотных замен (3 замены и одна делеция аминокислоты) обнаружено в капсидном белке, длина которого 116 аминокислот. По одной мутации, не приводящей к существенному изменению свойств аминокислоты (замены типа Ala/Val), обнаружено в структурных белках ргМ и Е (белок вирусной оболочки). В неструктурном белке NS2В, являющемся частью сериновой протеазы вируса, обнаружена замена (Phe/Val), которая может более существенно поменять конформацию белка, а в неструктурном белке NS1 обнаружена мутация, приводящая к существенному изменению гидрофильности (Ser/Val). Две замены найдены в белке NS3 и по три замены найдены в белках NS4В и NS5.

Разработаны методы детекции мутаций в генах капсидного белка и белка NS3, пригодные для анализа потенциальной патогенности вируса в диагностических лабораториях методом ПЦР с последующими рестрикцией и электрофорезом.

Таким образом, показано, что патогенность вируса КЭ и его опасность для человека можно оценить посредством выявления нескольких мутаций в геноме. Ключевыми мутациями, влияющими на патогенность штаммов дальневосточного субтипа вируса КЭ, являются сочетание мутаций в капсидном белке вируса и в сериновой протеазе. Выдвинуто предположение о том, что мутации в сериновой протеазе изменяют конформацию фермента, и это предположение подтверждено методом математического моделирования трехмерной структуры комплекса.

Перспективы дальнейшего развития:

- по направлению «Геномика» – обнаружение ключевых мутаций, связанных с изменением патогенности вируса КЭ сибирского субтипа. Экспериментальное подтверждение гипотезы методами геномной инженерии;
- по направлениям «Биоинформатика» и «Протеомика» – построение 3D-модели сериновой протеазы вируса КЭ, кристаллизация белка и рентгено-структурный анализ, поиск лекарственных средств *in silico*.

Спасибо
за
внимание!

shdima@ib.komisc.ru