

УДК 579.25

## **СЕКВЕНИРОВАНИЕ КАК МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В МИКРОБИОЛОГИИ**

*Атаманова Е.Е., студентка 2 курса факультета ветеринарной медицины и биотехнологии  
Научный руководитель – Сульдина Е.В., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ  
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ*

**Ключевые слова:** секвенирование, амплификация ДНК, СВГ, метод Сангера, амплифицированные матрицы, ДНК-мишени.

*СВГ представляет собой вершину для характеристики штаммов и эпидемиологического анализа, она, вероятно, заменит традиционные методы типирования, обнаружения генов устойчивости и других исследований на основе последовательностей (например, ПЦР 16S рДНК) в ближайшем будущем.*

Геномика и секвенирование всего генома (СВГ) способны значительно расширить знания и понимание инфекционных заболеваний и клинической микробиологии. Рост и доступность настольных анализаторов СВГ облегчили возможность применения геномики в клинической микробиологии и микробиологии общественного здравоохранения. Учитывая текущие ограничения ресурсов и инфраструктуры, СВГ наиболее применима для использования в лабораториях общественного здравоохранения, референс-лабораториях и лабораториях, связанных с больничным инфекционным контролем. Поскольку СВГ представляет собой вершину для характеристики штаммов и эпидемиологического анализа, она, вероятно, заменит традиционные методы типирования, обнаружения генов устойчивости и других исследований на основе последовательностей (например, ПЦР 16S рДНК) в ближайшем будущем [3-5]. Хотя геномные технологии быстро развиваются, широкое внедрение их в клинические микробиологические лаборатории и лаборатории общественного здравоохранения ограничено потребностью в эффективных полуавтоматических конвейерах, стандартизированном контроле качества и интерпретации данных, экспертных знаниях в области биоинформатики и инфра-

структуре [1].

Первым шагом в большинстве процессов секвенирования является амплификация ДНК. Это необходимо, потому что измерение биохимических процессов с одномолекулярным разрешением настолько технически сложно. В методе Сангера это обычно делается путем клонирования ДНК в плазмиду и выращивания клонов; однако это имеет свои подводные камни, поскольку ДНК является биологически активной молекулой, следовательно, существуют врожденные предубеждения против определенных участков ДНК, которые имеют физические свойства, которые не реплицируются хорошо в *E. coli* или что код токсичных соединений [2].

Многие проблемы и ошибки, присущие секвенированию ДНК, возникают из-за того, что в ходе одной реакции оцениваются тысячи или миллионы амплифицированных матриц. Было бы гораздо лучше читать ДНК так же, как это делают клетки; как отдельные молекулы. Первый опубликованный отчет о секвенировании одной молекулы был сделан лабораторией Стивена Квейка. Этот метод включает гибридизацию ДНК-мишени с комплементарными праймерами [6-9], которые представляют собой стрептавидин-биотин, связанный с поверхностью кремнезема. Затем праймеры расширяются путем добавления нуклеотидов, меченных  $Sy3$  и  $Sy5$ ; по мере добавления каждого основания инкорпорация фиксируется с помощью камеры, установленной на микроскопе. Ограничением этой технологии является то, что она генерирует короткие считывания, которые на момент публикации составляли 5 бп; однако эта технология была взята на вооружение компанией (Helicos Biosciences Corporation, Кембридж, Массачусетс, США), которая сообщает о гораздо более длительных считываниях. Этот метод в высшей степени параллелен, и на 25-миллиметровом квадрате можно было бы одновременно упорядочить 12 миллионов шаблонов, так что даже при 5-битном чтении каждый «прогон» генерировал бы 60 миллионов баз информации [2].

Еще один метод одномолекулярного секвенирования, находящийся на очень ранних стадиях развития, включает «считывание» ДНК, когда она проходит через нанопору. Это не будет включать в себя ферментативную реакцию расширения какого-либо вида, но вместо этого физические свойства молекулы будут считываться, когда основания проходят через крошечную пору. Теоретически этот метод не имел бы ограничений на длину считывания, и, следовательно, если

бы технические препятствия были преодолены, он мог бы революционизировать методы секвенирования генома [2].

*Библиографический список:*

1. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology / J.C.Kwong, N.McCallum, V.Sintchenko, B.P.Howden // Pathology -2007.- Том 47, №3. С.- 199-210.
2. Hall N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology /N. Holl// Experimental Biology -2007.- Том 201, №9. С. – 1518-1525.
3. Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага *Bacillus cereus* Fbc - 28 УГСХА/ Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Е.В. Сульдина// Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.- 2018.- № 2 (42).- С. 216-222.
4. Molecular-genetic characteristics of strains of proteus bacteriophages/ N.A. Feoktistova, D.A. Vasilev, A.V. Mastilenko, E.V. Suldina, S.N. Zolotukhin, A.L. Toigildin, I.A. Toigildina, A.V. Dozorov, V.A. Isaichev, I.L. Obukhov// Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.- 2018.- Т. 9. № 4.- С. 200-206.
5. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов протейных бактериофагов/ Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, Е.В. Сульдина, А.В. Мاستиленко// Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.- 2018.- № 1 (41).- С. 124-129.
6. Сульдина Е.В. Разработка систем ПЦР - детекции бактериофагов *Proteus phage (pr 4 - угсха)*, *Enterobacter phage (e7)* и *Yersinia phage (ye 3-f2)*/ Е.В. Сульдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко//Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.- 2019.- № 2 (46).- С. 140-146.
7. Сульдина Е.В. Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага *Listeria fL.m 4 УЛГАУ*/ Е.В. Сульдина, А.В. Мاستиленко, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев//Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.- 2019. -№ 4 (48).- С. 129-135.
8. Feoktistova N.A. Development of PCR detection system of bacteriophages  $Pr_4$  UGSHA,  $E_7$  ULSAU and  $Ye_3$  ULSAU/ N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev, A.V. Mastilenko, E.V. Suldina [и др.]//Ambient Science.- 2019.- Т. 6. № 2.- С. 26-30.
9. Сульдина Е.В. Молекулярно-генетическая характеристика бактериофагов *Enterobacter spp/* Е.В. Сульдина, Н.А. Феоктистова, А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев // Саратовский форум Ветеринарной медицины и продовольственной безопасности Российской Федерации. Материалы Националь-

ной научно-практической конференции.-Саратов: ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова, 2018.- С. 279-282.

## **SEQUENCING AS A METHOD OF MOLECULAR GENETIC RESEARCH IN MICROBIOLOGY**

*Atamanova E. E.*

**Keywords:** *sequencing, DNA amplification, SVG, Sanger method, amplified matrices, target DNA.*

*SVG represents a pinnacle for strain characterization and epidemiological analysis, and is likely to replace traditional methods of typing, resistance gene detection, and other sequence-based studies (e.g., 16S rDNA PCR) in the near future.*