

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО МЕТОДА ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОТИЧЕСКОГО СОСТАВА МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

М.М. Майрамбекова¹

Научный руководитель – к.м.н., научный сотрудник И.В. Салтыкова²

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет
634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина 30

²Сибирский государственный медицинский университет
Центральная научно-исследовательская лаборатория
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт 2 стр.18, mkg.de@inbox.ru

Использование современных молекулярно-генетических методов идентификации состава сообщества микроорганизмов является актуальным направлением в молекулярной биологии. В настоящее время есть данные о том, что выявляемость различных видов микроорганизмов с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования генов 16s рРНК в первую очередь определяется эффективностью выделения ДНК из биологического материала [1]. Однако, в процессе выделения ДНК из таких биологических материалов, как мокрота и фекалии, возникают трудности, так как каждый из этих материалов содержит собственный набор примесей (ингибиторов), негативно влияющих на последующие этапы секвенирования. Недостаток информации об особенностях различных методов пробоподготовки и отсутствие четких утвержденных требований к характеристикам наборов для выделения ДНК затрудняет выбор методики для решения конкретной задачи. В свою очередь, эффективность выделения ДНК существенно зависит от способа пробоподготовки мокроты, обеспечивающей разжижение материала и повышение степени гомогенизации. Поэтому для оптимального выбора методики выделения ДНК для последующего высокопроизводительного секвенирования одним из важных моментов является этап пробоподготовки.

Цель исследования – подобрать оптимальный метод выделения ДНК из образцов мокроты больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) для проведения высокопроизводительного секвенирования генов 16s рРНК.

Материалы и методы. В исследовании были включены образцы мокроты больных ХОБЛ. Мокроту собирали от 10 пациентов, после чего был приготовлен микс из десяти образцов мокроты, который использовали для дальнейшего анализа. Приготовленный микс

образцов мокроты хранили при -80°C . Исследовали 4 метода пробоподготовки с дальнейшим выделением ДНК. Первый метод включал обработку мокроты N-ацетил-L-цистеином в фосфатно-солевом буфере в концентрации 1% и 2,5%. N-ацетил-L-цистеин является разжижающим агентом за счет ослабления дисульфидных связей в белках. Второй метод пробоподготовки заключался в обработке мокроты реагентом Sputasol (Oxoid) (0,1 М раствор дитиотреитола), который используется для разжижения мокроты. Также исследовали комбинацию Sputasol (Oxoid) с ферментами: мутанолизин, лизоцим и лизостафин в равных концентрациях. Известно, что данные ферменты обеспечивают мягкий лизис клеток. Четвертый способ пробоподготовки мокроты включал обработку 1% DDT (дихлордифенилтрихлорметилэтан), растворенным в 0,9% NaCl. DDT является восстанавливающим агентом, разрушающим муцины, и используется для разжижения и гомогенизации мокроты [2].

Процедура выделения ДНК включала следующие этапы: гомогенизация и лизис образцов, осаждение ДНК двумя объемами 96% этанола с добавлением ацетата натрия с последующей двухкратной отмывкой осадка 80% этанолом.

Метагеномный анализ в формате оценки разнообразия последовательностей гена 16s рРНК в суммарном образце ДНК был осуществлен с помощью секвенатора нового поколения Miseq Illumina. Биоинформатическую обработку проводили с использованием Qiimepipeline версия 1.7.1.

Результаты исследований. В результате проведенного исследования с использованием высокопроизводительного секвенирования генов 16s рРНК успешно отсекуены были только образцы, выделенные с использованием метода пробоподготовки с реагентом Sputasol

(Oxoid). Можно утверждать, что Sputasol (Oxoid), содержащий дитиотреитола является наиболее эффективным агентом для разжижения мокроты. Дитиотреитол более эффективно снижает вязкость мокроты, чем другие реагенты. С помощью выбранного метода с использованием Sputasol (Oxoid) в анализируемом образце мокроты был определен микробиотический состав и установлено, что преобладающими в микробиоте проанализированных образцов являются

представители родов *Streptococcus* (41,29%) и *Haemophilus* (15,91%).

Вывод: для определения микробиотического состава мокроты с использованием технологии секвенирования нового поколения оптимальным методом пробоподготовки мокроты для последующего выделения ДНК является разжижение биоматериала с использованием Sputasol (Oxoid).

Список литературы

1. Kairabi S.H. *Profiling of Bacterial Communities in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Doctoral thesis. University of Leicester. Leicester, 2014.– P.270.*
2. Tsoumakidou M., Tzanakis N., Siafakas N.M. // *Respiratory Medicine, 2003.– Vol.97.– №8.– P.863–871.*

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *Pseudomonas sp.* НА МИНЕРАЛЬНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ С БУТАНОЛОМ/ТРЕТБУТАНОЛОМ В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА

Е.Ю. Макаренко

Научный руководитель – к.х.н., доцент А.П. Асташкина

Национальный исследовательский Томский политехнический университет
634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина 30, evgenia_eka_18@mail.ru

В настоящее время во всем мире наблюдается интерес к синтезу ценных органических соединений с помощью микроорганизмов [1]. При проведении синтеза необходимо подбирать оптимальные условия, учитывая особенности продуцента. Особое внимание стоит уделить выбору источника углеродного питания, играющего важную роль в ходе получения целевого продукта [2].

При выборе микроорганизмов наибольший интерес представляют простые бактерии, такие как микроорганизмы рода *Pseudomonas sp.* Разнообразие биосинтетических и катаболических реакций, высокая скорость роста на простых по составу средах, широкие возможности для генноинженерного манипулирования, позволяют рассматривать их как перспективный объект для работ в области биотехнологии [3].

Таким образом, целью нашей работы было исследовать жизнеспособность бактерий рода *Pseudomonas sp.* на минеральной питательной среде с бутанолом и третбутанолом.

Исследование проводилось в колбах, объемом 50 см³ на жидкой минеральной питатель-

ной среде Адкинса, с добавлением бутанола и третбутанола (10% от общего объема) в качестве источника углерода. Культивирование проводилось при постоянном перемешивании 80–100 об/мин., при температуре 37 °С, в течение 48 часов. Микробиологический анализ на определение численности микроорганизмов проводили с использованием метода предельных разведений (Мак-Креди) через 8, 12, 24, 36, 48 часов.

По полученным данным были построены кривые роста, рассчитаны удельная скорость роста и время генерации для культуры. Так, при использовании в качестве источника углерода бутанола/третбутанола стационарная фаза роста у бактерий наблюдается через 48 часов. Однако, наименьший индукционный период (8 ч.) и наибольший экспоненциальный период (28 ч.) наблюдается при использовании третбутанола. Это говорит о том, что при использовании третбутанола синтез ферментов наступает через 8 часов, а с бутанолом только через 12 ч. Установили, что удельная скорость роста культуры на питательной среде с третбутанолом составила 0,16 ч⁻¹, время генерации 4,3 ч, с бутанолом –