

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Волгоградский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Кафедра «молекулярной биологии и генетики»

Факультет: медико-биологический  
Направление подготовки: 06.03.01 «Биология»  
(профиль «Генетика»)

Отчетная работа  
по результатам выполнения индивидуальных заданий  
профильной учебной практики:  
«Профильная учебная практика по генетике»

на тему:

«Гибридизация нуклеиновых кислот. Денатурация и ренатурация. Примеры использования в молекулярно-генетических экспериментах»

*Отлично*  
*ИЕ*  
*24.07.19г.*

**Выполнили:**  
студентки 3 курса  
301 группы  
Васенко Е.А.,  
Жерихова Я.Н.,  
Завалиева Д.П.

**Проверила:**  
доцент кафедры молекулярной биологии и генетики  
к.м.н. Корсакова Ирина Игоревна

## Содержание

Введение.....	3
1. Гибридизация нуклеиновых кислот.....	4
2. Денатурация и ренативация нуклеиновых кислот.....	6
3. Методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот.....	10
Заключение.....	11
Список литературы.....	12

## Введение

Вторичная структура нуклеиновых кислот образуется за счёт слабых взаимодействий - водородных и гидрофобных. Поэтому если водный раствор ДНК нагреть до 100 °С, то связи, удерживающие две цепи двойной спирали вместе, разрушаются. В результате разрыва водородных и гидрофобных связей цепи ДНК расходятся. Этот процесс называют "денатурация". Однако если раствор, содержащий денатурированную ДНК, очень медленно охлаждать, то могут получиться двухспиральные структуры, идентичные исходным. Такой процесс получил название "ренативация".

На явлении денатурации и ренативации основан метод, называемый "молекулярная гибридизация". Процесс гибридизации может осуществляться между двумя любыми цепями нуклеиновых кислот (ДНК-ДНК, ДНК-РНК) при условии, что они содержат комплементарные последовательности нуклеотидов. Такие гибридные структуры можно выделить центрифугированием в градиенте плотности сахарозы или наблюдать в электронном микроскопе.

Методом молекулярной гибридизации можно установить:

- сходство и различие первичной структуры разных образцов нуклеиновых кислот;
- различие ДНК, выделенных из организмов разных видов;
- идентичность ДНК всех органов и тканей одного организма[1].

## 1. Гибридизация нуклеиновых кислот.

Реакцию гибридизации используют в генетической инженерии для создания гибридных молекул ДНК, а также как эффективный метод для выявления определенных последовательностей в ДНК и РНК. Если водный раствор ДНК нагреть до температуры 96-100 °С и сильно защелочить (рН > 13,0), то ДНК диссоциирует на отдельные цепи. Этот процесс денатурации ДНК обратим, поскольку если две изолированные цепи ДНК выдерживать определенное время при 65 °С, то они вновь спариваются, образуя двойную спираль, что и называют ренатурацией, или гибридизацией (отжигом). Гибридизация может идти между одинарными цепями ДНК и/или РНК (конечно, если они имеют комплементарные последовательности нуклеотидов), что приводит к образованию двойных цепей (дуплексов) разного состава: ДНК : ДНК; РНК : РНК; ДНК : РНК.

При конструировании гибридных ДНК гибридизация нуклеиновых кислот реализуется как правило в двух основных стратегиях (методах) получения рекомбинантных ДНК: коннекторной и рестриктазно-лигазной.

Коннекторный метод создает условия для гибридизации продуктов рестрикции разных геномов путем наращивания на их концах комплементарных олигонуклеотидных участков. Гибридизация (отжиг) этих ферментов ведет к образованию гибридных молекул ДНК. В этом методе используют 3 фермента: 5'-экзонуклеазу, терминальную нуклеотидил-трансферазу и ДНК-лигазу. Именно этим методом П. Берг и сотрудники получили в 1972 г. первую гибридную молекулу ДНК.

Рестриктазно-лигазный метод наиболее прост и популярен в генетической инженерии. В этом методе с использованием одной рестриктазы II, дающей фрагменты рестрикции с «липкими концами», гибридизация между фрагментами хромосомной ДНК и ДНК-плазмидой осуществляется без дополнительной процедуры наращивания комплементарных концов. После окончания гибридизации остается только сшить полинуклеотидные фрагменты с помощью ДНК-лигазы.

Гибридизацию используют для нахождения числа определенных нуклеотидных последовательностей (генов) в ДНК. Для этой цели применяют ДНК-зонды - радиоактивные фрагменты ДНК с известной нуклеотидной последовательностью. Метку в зонд вводят путем ник-трансляции. Это очень точный метод, который позволяет выявить один ген в клетке. Так выявляют отдельные (уникальные гены), а также гены, представленные в геноме десятками или сотнями копий.

Для локализации специфичных последовательностей нуклеиновых кислот в хромосомах и клетках используют гибридизацию *in situ*. При этом ДНК-зонды гибридизуют с хромосомами после кратковременного воздействия щелочью. Далее места гибридизации выявляют с помощью радиоавтографии. Применяют не только радиоактивные, но и химически меченные ДНК-зонды. Для этого при синтезе зонда используют нуклеотиды, содержащие боковую цепь биотина, которую после гибридизации окрашивают стрептовидином. С помощью гибридизации *in situ* можно выявить локализацию определенных видов мРНК в клетках и таким образом судить о дифференцировке в клетках эмбриона. Популярной биологической моделью таких исследований являются эмбрионы плодовой мушки дрозофилы.

Гибридизацию используют для выявления транскрибируемых и не-транскрибируемых последовательностей в ДНК. При этом анализируются продукты гибридизации ДНК и матричных РНК, что позволяет выявить активные (транскрибируемые) участки в молекулах ДНК.

Гибридизация широко используется для выявления определенных нуклеотидных последовательностей в смеси рестрикционных фрагментов. Такой прием носит название блоттинг (от англ. blot - промокать). Рестрикционные фрагменты фракционируют методом

электрофореза (применяют высокоскоростное центрифугирование в градиенте плотности CsCl с использованием этидия бромида). Это позволяет разделить до 500 фрагментов, отличающихся по размерам всего на один нуклеотид. Затем гель агарозу совмещают с листом нитроцеллюлозной бумаги. В результате диффузии фрагменты частично переходят на этот лист, и таким образом получается отпечаток (реплика) с геля. Затем методом радиоавтографии с использованием радиоактивного ДНК-зонда определяют на реплике положение фрагментов, которые гибридизуются с зондом [2].

## 2. Денатурация и ренатурация

Денатурация нуклеиновых кислот – это процесс нарушения водородных и вандерваальсовых связей между отдельными основаниями и полинуклеотидными цепями в целом.

Денатурация нуклеиновых кислот может быть связана целым рядом воздействий: нагреванием, значительными изменениями рН, крайним снижением ионной силы и др. Наибольший интерес представляет термическая денатурация. Ее значение и высокая степень изученности привели к тому, что нередко вместо наиболее широкого термина “денатурация” пользуются термином “плавление”, даже в случаях, когда разъединение цепей вызывается не нагреванием, а другими факторами.

Термическая денатурация нуклеиновых кислот регистрируется с помощью целого ряда показателей: оптической плотности, оптической активности, и ряда других, непосредственно связанных со спирализацией. Естественно также, что денатурация, снижая жесткость нитей, может регистрироваться по вязкости, по дисперсии оптического вращения, по двойному лучепреломлению и т.п. Наиболее показательно и удобно измерение оптической плотности при 260 мкм. Максимальное повышение оптической плотности составляет обычно около 80% от того, которое наблюдается при полном распаде нуклеиновой кислоты до мононуклеотидов.

При температуре, которая вызывает почти 100% гиперхромный эффект, сохраняется существенная доля водородных связей, которые еще удерживают цепочки друг возле друга, хотя биспиральной структуры уже не существует. Это доказывается, в частности, с помощью экспериментов по скорости обмена водорода аминных и иминных групп со средой, так как водород, вовлеченный в Н – связи, обновляется гораздо медленнее. В то же время вандерваальсовы связи между основаниями полностью нарушаются при этой температуре, что демонстрирует важную их роль в стабилизации биспиральной структуры. Только нагревание до температур, на 5 – 7 градусов превышающих ту, при которой прекратилось повышение оптической плотности, вызывает полное расхождение цепей с образованием клубков, характерных для одноцепочечных ДНК.

Нагревание, как уже было сказано, отнюдь не является единственным агентом, денатурирующим ДНК. Подкисление до значений рН, меньших 4,0, а надежнее – до рН < 3,0, или подщелачивание до значений рН, больших 11,0, резко повышает либо вероятность образования  $\text{NH}_3^+$ - групп, либо перехода кетогрупп в енольные, что нарушает водородные связи между основаниями и ведет к более или менее полному расхождению цепей.

Биспиральные структуры устойчивы к снижению ионной силы, но при  $\mu$ , меньшем  $10^{-4}$ , экранирование фосфатных групп солями нарушается в такой степени, что наступает расхождение цепей. В отличие от рН можно отметить влияние ионной силы на температуру плавления в широком интервале значений  $\mu$ . Это обстоятельство используется в тех случаях, когда необходимо исследование кривых плавления ДНК при низких температурах, например в экспериментах с хроматином, содержащим ряд белковых компонентов, денатурирующихся уже при 50 – 60°C. Снижая ионную силу от физиологических значений до примерно  $10^{-3}$ , удается уменьшить  $T_{\text{пл}}$  ДНК до 50°C и ниже.

Существует и ряд других агентов, денатурирующих нуклеиновые кислоты или, чаще, способствующих денатурации. К последним относятся многие соединения, склонные к образованию водородных связей: мочевины, гуанидин – хлорид, спирты и многие другие. Полагают, что их эффект обусловлен не прямым воздействием на межнуклеотидные Н – связи, а стабилизацией уже разъединившихся цепей. Содействуют, естественно, денатурации и агенты, модифицирующие основания так, что нарушается их способность к образованию водородных связей.

Весьма показательным сопоставлением процессов денатурации двуцепочечных ДНК и биспиральных участков в одноцепочечных РНК. Во – первых, меньшая доля и неполноценность этих участков проявляются в меньшем значении  $T_{пл}$  и меньшей абсолютной величине гиперхромного эффекта. Во – вторых, большая внутримолекулярная гетерогенность спирализованных участков несколько «растягивает» кривую плавления вдоль оси абсцисс. В – третьих, наконец, в случае РНК могут наблюдаться соотношения между изменениями оптической плотности и вязкости, обратные тем, которые наблюдаются при плавлении ДНК. В самом деле, денатурация ДНК сопровождается снижением упругости молекул, переходом гигантских клубков или палочковидных структур к малым клубкам, что выражается в резком падении вязкости. В случае РНК небольшие спирализованные участки, чередующиеся с одноцепочечными участками, даже способствуют повышению компактности клубка при средних значениях ионной силы. Поэтому плавление РНК может приводить, наряду с гиперхромностью, не к понижению, а к повышению вязкости за счет разрыхления клубка.

Процесс денатурации нуклеиновых кислот оказался обратимым. Постепенное охлаждение раствора денатурированной ДНК или выдерживание его при температуре, примерно на  $20^{\circ}$  меньшей температуры плавления, позволяет полностью восстановить нативность молекулы. Напротив, быстрое охлаждение до низких температур ( $-20^{\circ}\text{C}$  и ниже) фиксирует денатурированное состояние на длительное время. Скорость ренатурации тем больше, чем выше концентрация и однородность, гомогенность молекул исходной ДНК по их нуклеотидной последовательности. В растворе денатурированной абсолютно гомогенной ДНК вероятность того, что столкнувшиеся полинуклеотидные цепочки окажутся комплементарными, равна 0,5. Присутствие других молекул, с иной последовательностью оснований, исключающей сплавление с цепочками первой ДНК, снижает вероятность встреч, которые заканчивались бы ренатурацией. Следовательно, быстрота ренатурации ДНК поможет служить мерой ее гомогенности. Это обстоятельство послужило основой для разработки метода сравнительной оценки разнообразия нуклеотидных последовательностей в природных ДНК из разных организмов.

Своеобразным следствием процесса ренатурации, с одной стороны, и наличия большого числа повторяющихся нуклеотидных последовательностей в ДНК высших организмов, с другой, явился феномен, открытый недавно Thomas и сотр. (1970). Если большие фрагменты ДНК, состоящие из повторяющихся участков, подвергнуть кратковременному воздействию специфических нуклеаз, например, так, чтобы с обоих концов фрагмента удалить часть нуклеотидов с 3'-конца, то обнаружившиеся 5'-концевые цепочки будут способны замыкаться друг на друга, сплавляться и давать биспираль. При этом фрагмент ДНК образует кольцо. Размеры и среднее число колец, образующихся из ДНК, устанавливают с помощью электронного микроскопа и другими методами.

Если свести вместе продукты денатурации целых молекул ДНК, лишь частично совпадающих по нуклеотидным последовательностям, то в условиях ренатурации будут возникать двуцепочечные молекулы не только из гомологичных цепей, но и из цепей разных ДНК. Естественно, в последнем случае биспиральные структуры будут возникать не на всем протяжении молекул. Этот процесс часто называют молекулярной гибридизацией. Вообще говоря, термин этот неоднозначен, ибо молекулярной гибридизацией можно было бы назвать обмен биспиральными фрагментами между молекулами ДНК. Однако общепринятым является именно первое значение термина. Чем ближе по первичной структуре сводимые ДНК, чем более они гомологичны, тем будет больше протяженность спирализованных участков в гибридной молекуле. По доле последних можно количественно оценивать сходство нуклеотидных последовательностей ДНК разных организмов. Если же учесть, что последовательность нуклеотидов большей части ДНК – это и есть материализованная

генетическая информация, то становится очевидным, что таким способом можно получить ценнейшие данные о степени генетической близости разных организмов и подойти к решению труднейших проблем таксономии и эволюции.

Предложен целый ряд методов количественной оценки степени гомологии разных ДНК при молекулярной гибридизации. При этом можно идти либо по пути гибридизации наиболее высокомолекулярных ДНК, измеряя далее тем или иным способом долю образовавшихся биспиральных участков, либо предварительно дробить обе или одну из сравниваемых ДНК на фрагменты, близкие по размеру к минимальным цистронам (генам), и оценивать далее, какая доля фрагментов может гибридизоваться. Более практичным оказался второй путь, хотя вначале внимание исследователей привлек первый. Так, четкие результаты без предварительного дробления ДНК были получены, когда одна из ДНК «утяжелялась» введением  $N^{15}$  (через среды выращивания данного организма), затем гибридизовалась с «легкой» ДНК из второго организма, и смесь разделялась ультрацентрифугированием в градиенте плотности Cs Cl. Гибридная ДНК, содержащая лишь одну нить с  $N^{15}$ , занимала промежуточное положение между ДНК I и II, которые также частично ренатурировались. Вероятность встречи полинуклеотидной цепочки из каждой ДНК с цепочкой из своей или чужой ДНК легко рассчитать. Она оказалась в удовлетворительном соответствии с действительным количественным распределением ДНК при градиентном ультрацентрифугировании между тремя пиками: тяжелой, легкой и промежуточной ДНК. Исключением были лишь случаи, когда степень гомологии ДНК I и II была столь низкой, что гибридная ДНК оказывалась крайне нестабильной, и вновь разъединившиеся цепи рано или поздно сталкивались и спирализовались с полностью гомологичной цепью из своей ДНК. Однако, даже получив выраженный пик гибридной ДНК, еще нельзя было сделать заключения о том, какова в ней доля биспиральных участков и какова количественно степень гомологии. Один из наиболее эффективных приемов, позволивших решить эту задачу, был основан на существовании нуклеаз, расщепляющих только одноцепочечные нуклеиновые кислоты, но неспособных атаковать биспиральные участки. Обработка смеси продуктов ренатурации такими нуклеазами (перед ультрацентрифугированием в градиенте) позволяла разрушить неспирализовавшиеся и, следовательно, некомплементарные участки в гибридных ДНК. После разделения смеси количество оставшихся биспиральных фрагментов могло быть измерено, что позволяло рассчитывать долю гомологичных участков. Широкое применение этого метода было ограничено, прежде всего, относительной малодоступностью и громоздкостью градиентного ультрацентрифугирования, а также трудностью получения гибридной ДНК при низкой степени гомологии. Тот же метод оказался более эффективным в случае предварительного дробления ДНК. Однако это не снимало технических осложнений. Поэтому наибольшее распространение получила группа методов, количественно регистрировавших молекулярную гибридизацию фрагментов либо без разделения продуктов ренатурации, либо с более практичной техникой разделения – при посредстве фиксации одной из сравниваемых ДНК. Так, количественную оценку молекулярной гибридизации предварительно раздробленных и денатурированных ДНК разных организмов можно произвести, изучая кинетику процесса с помощью тех же приемов, что были описаны выше для ренатурации гомологичных ДНК.

Если сводимые ДНК совсем не гомологичны и вовсе не образуют гибридных фрагментов, то они будут ренатурироваться в смеси независимо друг от друга.

Изложенный способ оценки гомологии является прямым следствием углубленного изучения кинетики ренатурации и технически не очень сложен. Однако по чувствительности, а также по применимости для оценки гомологии не только между ДНК, но и между ДНК и РНК, он значительно уступает наиболее распространенным и апробированным методам



другого типа, основанным на измерении количества гибридизировавшейся нуклеиновой кислоты по радиоактивности. При этом одна из взаимодействующих нуклеиновых кислот фиксируется либо в агар – агаре, либо на целлюлозном фильтре. Ее не дробят, а лишь подвергают денатурации. Полинуклеотидная цепочка с молекулярным весом несколько миллионов и более не способна диффундировать из агарового геля (ее вводят в гель, смешивая денатурированную ДНК с расплавленным агаром, и затем охлаждают) и полностью задерживается целлюлозными фильтрами специальных марок. В таких условиях исключена ренатурация этой ДНК, ибо в результате отсутствия диффузии невозможны столкновения нитей. Напротив, вторая из сравниваемых ДНК не только денатурируется, но и дробится с таким расчетом, чтобы ее фрагменты могли свободно диффундировать в агаровом геле или переходить через целлюлозный фильтр и, встречаясь с комплементарными им участками на фиксированной ДНК первого организма, гибридизироваться с ней.

Молекулярный вес фрагментов второй ДНК измеряется сотнями тысяч. В тоже время суммарные молекулярные веса ДНК геномов обоих сравниваемых организмов обычно измеряются многими миллионами. Поэтому, оценив, какое количество второй ДНК прочно связалось с первой, легко рассчитать долю гомологичных нуклеотидных последовательностей. Вторую ДНК метят путем синтеза из радиоактивных предшественников (*in vivo* или *in vitro*). Реакцию проводят в условиях, оптимальных для ренатурации (около 70°C). Негибридизировавшиеся фрагменты отмываются, и измеряется радиоактивность связанной ДНК.

Далее был разработан еще более чувствительный и тонкий вариант метода Bolton и McCarthy – так называемая конкурентная гибридизация. Сущность его состоит в сведении двух сравниваемых фрагментированных РНК (или двух ДНК) с денатурированной и фиксированной ДНК. Одна из РНК помечается радиоактивным изотопом. Если обе РНК комплементарны ДНК, но обладают несовпадающими нуклеотидными последовательностями, то они будут взаимодействовать с разными ее участками и не будут взаимно препятствовать гибридизации. Если же РНК идентичны, то отмечается небольшая степень взаимного подавления гибридизации. Наконец, промежуточные по интенсивности проявления конкуренции позволяют количественно оценить долю общих нуклеотидных последовательностей сравниваемых РНК. Этот прием оказался особенно эффективным при сравнении разных НК в наиболее трудных ситуациях [3].

### 3. Методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот.

Молекулярная гибридизация - молекулярно-биологическая техника, основанная на способности одноцепочечной молекулы изучаемой ДНК/РНК специфически соединяться с комплементарными одноцепочечными зондами (молекулами-свидетелями) с образованием гибридных дуплексов, которые флюоресцируют или меняют цвет реакционной смеси. Методы молекулярной гибридизации позволяют выявлять степень сходства двух молекул ДНК, что используется для эволюционного анализа, для идентификации и типирования микроорганизмов, а также для изучения экспрессии генов.

Варианты проведения молекулярной гибридизации.

1. В растворе.
2. В тканевых срезах (*in situ*). Тканевые срезы депарафинируют, демаскируют нуклеиновые кислоты в них и наносят гибридизационный раствор, содержащий специфические меченые зонды. Проводят денатурацию ДНК, гибридизацию, отмывку несвязавшихся зондов, после чего осуществляют детекцию гибридизировавшихся зондов по флюоресценции.
3. На микрочипах (эррей гибридизация) – наиболее совершенный метод. Позволяет наносить и фиксировать до нескольких сотен тысяч ДНК-зондов на поверхность стеклянного чипа, что дает возможность изучать одновременно все гены, присутствующие в ДНК микроорганизма.
4. На мембранах. Изучаемую ДНК фиксируют на мембранах и к ней добавляют гибридизационный раствор, содержащий специфические меченые зонды. В случае комплементарности зонд связывается с ДНК, после отмывки несвязавшихся зондов регистрируют флюоресценцию.

Этапы реакции гибридизации на мембранах:

А. Выделение ДНК. Методы аналогичны методам выделения ДНК для проведения ПЦР.

Б. Получение мелких фрагментов изучаемой ДНК (не более 5000 – 10000 п. о.). Для этого проводят либо рестрикцию (нарезку рестриктазами) крупной молекулы ДНК, либо ПЦР с образованием небольших ампликонов, либо обработку ультразвуком.

В. Нанесение ДНК на мембрану и фиксация ДНК на мембране: – дот-блоты или слот-блоты. Перед нанесением ДНК денатурируют – превращают в одноцепочечные молекулы. Затем небольшие фрагменты изучаемой ДНК наносят на мембрану в виде точек (дот-блоты), либо полосок (слот-блоты). – саузэрн-блоты. Небольшие фрагменты изучаемой ДНК предварительно разделяют электрофорезом в полиакриламидном геле. ДНК переносят из геля на поверхность мембран. Перенесенную на мембрану ДНК фиксируют при 80<sup>0</sup>С или УФ светом.

Г. Гибридизация проводится в несколько этапов: – обработка предгибризационным буфером мембраны с ДНК, что увеличивает связывающую способность мембраны; – приготовление гибридизационного раствора, содержащего буфер и меченый зонд; – программирование гибридизационной камеры и проведение гибридизации при 65<sup>0</sup>С.

Д. Анализ результатов. Если зонд комплементарен одноцепочечному участку ДНК изучаемого микроорганизма, происходит связывание зонда и исследуемой ДНК. Некомплементарные несвязавшиеся зонды удаляют промыванием. В месте связывания зонда выявляют флюоресценцию или изменение цвета [4].

## **Заключение**

Метод гибридизации нуклеиновых кислот, как и ПЦР, позволяет идентифицировать возбудитель в пробе без предварительного им деления. Для проведения анализа синтезируют одноцепочечный ДНК- или РНК-зонд, комплементарный специфическим нуклеотидным последовательностям возбудителя.

Зонд метят изотопом, ферментом или другой легко распознаваемой меткой. Исследуемый материал подвергается обработке с целью лизиса микроорганизмов, находящихся в биопробе, выделения и денатурации ДНК. Далее проводят инкубацию зонда с исследуемым образцом и измерение количества меченой ДНК, вступившей в гибридизацию с ДНК, находящейся в исследуемой пробе. Реакция может происходить как на твердофазных сорбентах, так и в растворе, но обязательным условием становится отмывка несвязавшихся количеств меченого зонда. Чувствительность метода гибридизации нуклеиновых кислот уступает таковой ПЦР и составляет 10<sup>3</sup> микроорганизмов в пробе [5].

### Список используемых ресурсов:

1. Щелкунов С.Н., Генетическая инженерия [Электронный ресурс] : учеб.-справ. пособие / С.Н. Щелкунов. - 4-е изд., стер. - Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2010. - 514 с. - ISBN 978-5-379-01064-5 - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785379010645.html>.
2. Генетика : учебное пособие / Осипова Л. А., Зайцев В. Ф., Воробьев В. И. ; Астраханский гос. технический ун-т. - Астрахань : Изд-во АГТУ, 2009. - 455 с..
3. Бакай А.В., Генетика [Электронный ресурс] / Бакай А.В., Кочиш И.И., Скрипниченко Г.Г. - М. : КолосС, 2013. - 448 с. (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений) - ISBN 978-5-9532-0648-8 - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785953206488.html>
4. Аппель Б., Нуклеиновые кислоты: От А до Я [Электронный ресурс] / Б. Аппель [и др.] ; под ред. С.Мюллер ; пер. с англ.- 2-е изд. (эл.). - М. : БИНОМ, 2015. - 424 с. - ISBN 978-5-9963-2406-4-Режимдоступа:<http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785996324064.html>
5. Кухтевич Е.В., МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ИНФЕКЦИЯХ [Электронный ресурс] / Е.В. Кухтевич - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - ISBN -- - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/970410004V0011.html>