

УДК 578.81

DOI 10.18286/1816-4501-2021-4-136-141

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ
БАКТЕРИОФАГОВ PS.S-7 УЛГАУ И PS.S-27 УЛГАУ**

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Сулдына Екатерина Владимировна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Мастиленко Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Абдурахманов Ильнур Мынгалиевич, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47; e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae*, нуклеиновые кислоты, размер, бактериофаги, ДНК, метод, экстракция

В статье представлены результаты исследований по определению размера нуклеиновых кислот бактериофагов Ps.s-7 УЛГАУ и Ps.s-27 УЛГАУ. Во введении статьи обоснована актуальность исследований для классификации бактериофагов по типу и размеру нуклеиновой кислоты. Установлено методом экстракции на магнитных частицах и фенольно-хлороформной экстракцией, что максимальный расчетный размер для ДНК бактериофага Ps.s-7 УЛГАУ (изолирован из пробы почвы, характеристики: литическая активность, определяемая по методу Gracío, $2,0 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл, по методу Аппельмана – 10^8 , капельным тестом - n^9 ; спектр литического действия 85,7 %) составил 38137 п.н., для бактериофага Ps.s-27 УЛГАУ (изолирован из пробы почвы, характеристики: $1,0 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл по Грацио, по Аппельману – 10^8 , капельный тест - n^9 ; спектр литического действия составил 85,7 %) размер ДНК был равен 23744 п.н. В исследованиях использовали маркер молекулярного веса ДНК Quick-Load Extend DNA 500-48500 п.н., спектрофотометр «Nanodrop 2000/2000c» (ThermoFisher), применяли методику электрофореза в ПААГ. Полученные данные позволят определить филогенетическое родство бактериофагов Ps.s-7 УЛГАУ и Ps.s-27 УЛГАУ с аннотированными в базе NCBI бактериофагами, применяя Protein BLAST, активными в отношении фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae*, вызывающих опухолевые новообразования, гниение, прекращение роста и гибель части культивируемых человеком растений без загнивания, хлороз, некроз и т.п.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Ульяновской области РФ в рамках научного проекта № 19-44-730014

Введение

Тема изучения вирусов прокариот применительно к практике сельского хозяйства является крайне актуальной и востребованной в мировой практике, исследования по ней идут во множестве стран. На данный момент Россия имеет существенное отставание в данной тема-

тике, которое может быть легко преодолено с использованием существующего в нашей стране практического и фундаментального научного задела. «Одомашненные» человеком бактериофаги способны существенно изменить практику защиты растений от бактериозов и стать надежным инструментом [1-2].

В основе одной из современных классификаций бактериофагов лежит определение типа и размера нуклеиновой кислоты, составляющей их наследственный аппарат. Однако не менее важной характеристикой их филогении является и размер ДНК или РНК. По данным научных публикаций, размерность фагового генома регистрируется в пределах от 3,5 (бактериофаг MS2) до 498 (бактериофаг G) тысяч оснований/пар оснований (п.о.) [3-4]. В рамках выполнения проект «Фундаментальные основы разработки фагового препарата, специфичного для *Pseudomonas syringae*, и прикладные аспекты его применения для фагоидентификации и биопроектирования пищевых продуктов и сельскохозяйственного сырья» №19-44-730014, финансируемому РФФИ и правительством Ульяновской области, была сформулирована цель исследований - определение размера нуклеиновых кислот бактериофагов *Ps.s-7* УлГАУ и *Ps.s-27* УлГАУ, которые соответствовали основным критериям отбора объектов исследований для дальнейшей работы.

Материалы и методы исследований

Характеристика объектов исследований. Бактериофаг *Ps.s-7* УлГАУ был изолирован из пробы почвы (Самарская область, Кошкинский район, с. Большая Константиновка) и имел следующие характеристики: литическая активность, определяемая по методу Грацио, $2,0 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл, по методу Аппельмана – 10^8 , капельным тестом - n^9 ; спектр литического действия - специфичен для 85,7 % бактериальных штаммов *Pseudomonas syringae* из 14, выделенных из объектов внешней среды и типированных на основании бактериологических тестов. Бактериофаг *Ps.s-27* УлГАУ изолирован из пробы почвы (Самарская Ульяновская область Ульяновский район, п. Ундоры) и характеризовался следующими показателями: $1,0 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл по Грацио, по Аппельману – 10^8 , капельный тест - n^9 ; спектр литического действия составил 85,7 % на 14 бактериальных культурах *Pseudomonas syringae* [5-6].

Индикаторный штамм бактерий *Pseudomonas syringae* P. s.- 3 инкубировали 9 ± 1 часов в LB, далее 10 мкл добавляли в 10 мл LB, перемешивали орбитальным шейкером ($v = 150$ об / мин) до OD 695, равным 0,2. Затем 300 микролитров *Pseudomonas syringae* P. s.- 3 вносили в 100 мкл бактериофага *Ps.s-7* УлГАУ (*Ps.s-27* УлГАУ) ($\sim 10^6$ БОЕ/мл (PFU) / мл) и оставляли на 15 минут при температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$, далее добавляли 3 мл 0,7 % МПА (температура $40 \pm 2^\circ\text{C}$), перемешивали и инкубировали при

28°C . 40 миллилитров буфера SM вносили в сборную пробирку, перемешивали, инкубировали 9 ± 1 часов при 10°C , с целью создания условий для диффузии бактериофагов из МПА в буфер. Далее осуществляли центрифугирование при 250 g (25 мин). Осуществляли очистку супернатанта мембранными фильтрами (d пор 0,45 мкм), затем фильтрами с d пор 0,22 мкм. Фильтрат смешивали с 1/8 объемного раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000 (2,5 М NaCl, 20% (вес/объем) PEG 6000) (инкубация на льду в течение 30 мин). Далее осуществляли центрифугирование при 16000 g (10 мин), вводили в 0,5 мл 10 mM ТРИС ((pH=7,5), 10 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl)). Для разрушения нуклеиновой кислоты применяли 10 ед. ДНКазы I и 10 мкг / мл РНКазы А (параметры - 30 мин при 37°C). Проводили экстрагирование (Sambrook et al., 2001).

Для экстракции ДНК использовали коммерческий набор «УниМаг» («ВекторБест», Россия). Очищенные НК элюируются с поверхности частицы в малом объеме воды, свободной от нуклеаз (20–50 мкл). Это позволяет концентрировать РНК/ДНК при работе с малым количеством НК в образце. В чистую пробирку вводили 500 мкл лизирующей смеси с магнитными частицами, добавляли 100 мкл образца и перемешивали, используя вортекс, 4 ± 1 сек. Затем пробирки ставили в твердотельный термостат (15 минут при 56°C), проводили периодическое перемешивание. Ставили на 3 минуты пробирки на магнитный штатив, колбами-ловушками удаляли надосады; вводили 500 мкл промывочного раствора (№ 1), перемешивали вортексом 4 ± 1 сек, затем вновь использовали в течение 3 мин магнитный штатив и удаляли надосады. Добавляли 500 мкл промывочного раствора (№ 2) и осуществляли протокол, аналогичный для обработки промывочным раствором (№ 1). Надосады удаляли с применением колбы-ловушки и добавляли 1000 мкл этилового спирта (70 % р-р), перемешивали вортексом 4 ± 1 сек, использовали далее магнитный штатив в течение 3 мин, убирали надосады колбой-ловушкой. Осадок сушили при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$, добавляли 100 мкл элюирующего раствора, вортексировали 8 ± 2 сек. В заключении однородную взвесь термостатировали 15 мин при 80°C , затем использовали магнитный штатив в течение 3 минут.

В исследованиях использовали маркер молекулярного веса ДНК Quick-Load Extend DNA 500-48500 п.н., спектрофотометр «Nanodrop 2000/2000с» (ThermoFisher), применяли мето-

дику электрофореза в ПААГ. Методология исследований описана в научных публикациях [7 - 9].

Результаты исследований

Результаты наших ранее поставленных экспериментов по определению коэффициента чистоты (нуклеиновых кислот) НК свидетельствуют о том, что использование метода экстракции на магнитных частицах и фенольно-хлороформная экстракция дают максимальные результаты [10]. Однако коэффициент поглощения нуклеиновых кислот для методики с магнитными частицами значительно выше таковой у фенольно-хлороформной экстракции (в 1,07-3,91 раза). На рис. 1 представлены данные электрофореза экстрагированной ДНК бактериофага *Ps.s-7* УЛГАУ в ПААГ.

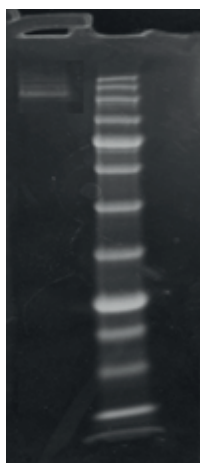


Рис. 1 - Электрофореграмма экстрагированной ДНК бактериофага *Ps.s-7* УЛГАУ в ПААГ. Трек 1 – Ps7-11, трек 2 – маркер молекулярного веса ДНК Quick-Load Extend DNA 500-48500 п.н.

Далее на основе маркера молекулярного веса бактериофага *Ps.s-7* УЛГАУ нами был построен калибровочный график (рис. 2-3).

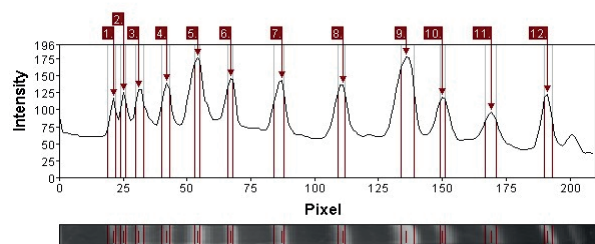
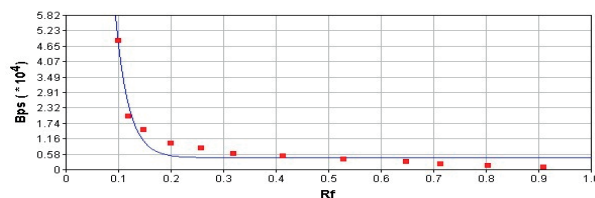


Рис. 2 - Профиль маркера молекулярного веса бактериофага *Ps.s-7* УЛГАУ Quick-Load Extend DNA



$$y = 23465687.2 * e^{(-40.082413 * x)} + 4634.67$$

$$R^2 = 0.946$$

Рис. 3 - Калибровочный график маркера молекулярного веса бактериофага *Ps.s-7* УЛГАУ Quick-Load Extend DNA

Результаты расчета молекулярного веса экстрагированной ДНК бактериофага *Ps.s-7* УЛГАУ представлены на рис. 4-5 и табл. 1.



Рис. 4 - Электрофореграмма экстрагированной ДНК бактериофага *Ps.s-7* УЛГАУ в ПААГ

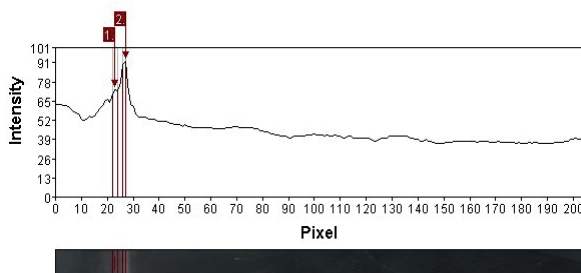


Рис. 5 - Профиль экстрагированной ДНК бактериофага *Ps.s-7* УЛГАУ в ПААГ

В результате экспериментов были определены размеры нуклеиновых кислот бактериофага *Ps.s-7* УЛГАУ. Максимальный расчетный размер составил 38137 п.н.

Определение молекулярного веса ДНК бактериофага Ps.s-7 УЛГАУ

Analysis info					
Show					
Lane #	Band #	Rf	Raw volume	Cal. volume	MW
2.	1.	0.111	215	-	38137
2.	2.	0.13	182	-	27033



Рис. 6 - Электрофореграмма экстрагированной ДНК бактериофага Ps.s-27 УЛГАУ в ПААГ. Трек 2 – Ps30, трек 1 – маркер молекулярного веса ДНК Quick-Load Extend DNA 500-48500 п.н.

Далее на основе маркера молекулярного веса бактериофага Ps.s-27 УЛГАУ был построен калибровочный график (рис. 7-8).

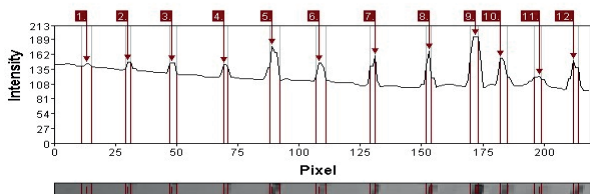


Рис. 7 - Профиль маркера молекулярного веса бактериофага Ps.s-27 УЛГАУ Quick-Load Extend DNA

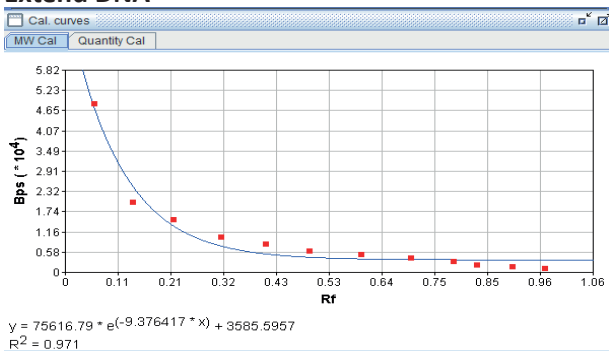


Рис. 8 - Калибровочный график маркера молекулярного веса бактериофага Ps.s-27 УЛГАУ Quick-Load Extend DNA

Результаты расчета молекулярного веса экстрагированной ДНК бактериофага Ps.s-27 УЛГАУ представлены на рис. 9-10 и табл. 2.

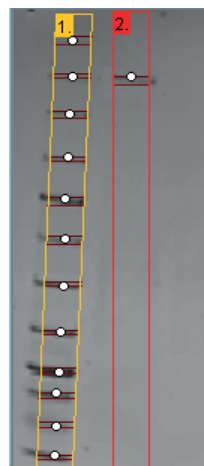


Рис. 9 - Электрофореграмма экстрагированной ДНК бактериофага Ps.s-27 УЛГАУ в ПААГ

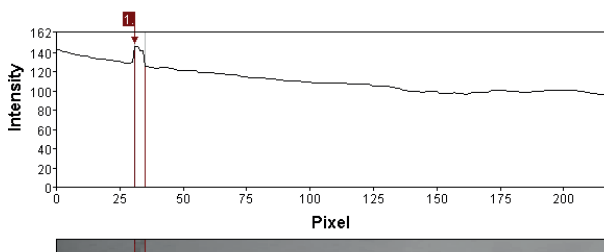


Рис. 10 - Профиль экстрагированной ДНК бактериофага Ps.s-27 УЛГАУ в ПААГ

Для бактериофага Ps.s-27 УЛГАУ размер нуклеиновых кислот составил 23744 п.н.

Обсуждение

По литературным данным, размер генома крупных ДНК-содержащих вирусов равен 2-4x10⁵ п.н. (200-450 т.п.н. у поксвирусов и вирусов герпеса), у у мелких вирусов зарегистрирован геном длиной 1 мкм, состоящий из 1,2 т.п.н. [11-12]

Проведенные С.Н. Золотухиным и Д.А. Васильевым (2016) исследования 14 штаммов бактериофагов, специфичных для родов

Определение молекулярного веса ДНК бактериофага Ps.s-27 УлГАУ

Analysis info					
Show					
Lane #	Band #	Rf	Raw volume	Cal. volume	MW
2.	1.	0.141	704	-	23744

Citrobacter, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, видов, *Y. enterocolitica*, *M. morganii* и *E. coli* сероваров O157:H7 и H- свидетельствуют об эффективности выделения нуклеиновой кислоты с применением фенольно-деградационного метода. Выявленные нуклеиновые кислоты бактериофагов вышеназванных представителей семейства Enterobacteriaceae были представлены ДНК размером 45083-67045 п.о [13].

В результате проведенных нами исследований было установлено, что применение методики экстракции на магнитных частицах и фенольно-хлороформная экстракция ведут к выходу матричной НК с максимальной чистотой. Определены размеры нуклеиновых кислот бактериофагов *Ps.s-7* УлГАУ и *Ps.s-27* УлГАУ. Максимальный расчетный размер для ДНК бактериофага *Ps.s-7* УлГАУ составил 38137 п.н., для бактериофага *Ps.s-27* УлГАУ размер ДНК был равен 23744 п.н.

Заключение

Так как в основе классификации семейств бактериофагов, используемой в настоящее время, лежит тип нуклеиновой кислоты генома бактериофага и описание морфологии его капсида [1, 14], полученные нами данные позволят в определить филогенетическое родство бактериофагов *Ps.s-7* УлГАУ и *Ps.s-27* УлГАУ с аннотированными в базе NCBI бактериофагами, применяя Protein BLAST, активными в отношении *Pseudomonas syringae*.

Библиографический список

1. Мирошников, К. А. Геномика и протеомика литических бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa* : спец. 03.01.04 ; 03.01.06 : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора химических наук / Мирошников Константин Анатольевич ; Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. – Москва, 2013. – 169 с.
2. Clokie, Martha R. J. Bacteriophages. Methods and Protocols. Volume 3 / Martha R. J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. - Humana Press, 2018. – 311 p.

3. Молекулярно-биологические и генетические принципы селекции терапевтических бактериофагов бактерий родов *Pseudomonas* и *Staphylococcus* / К. А. Мирошников, Е. Е. Куликов, О. С. Дарбеева, К. А. Лыско, Г. М. Игнатъев // Прикладная биохимия и микробиология. - 2014. - Т. 50, № 3. - С. 338.

4. Ackermann, H. W. Bacteriophage taxonomy / H. W. Ackermann // Microbiology Australia. - 2011. - Vol. - P. 5.

5. Разработка схемы выделения и бактериологической идентификации бактерий *Pseudomonas syringae* и ее апробация / Н. А. Феоктистова, А. К. Беккалиева, Д. А. Васильев, Е. В. Сульдина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2021. - № 2 (54). – С. 148-156.

6. Bacteriophages of *Pseudomonas syringae*: features of isolation and study of main biological properties / D. A. Vasiliev, N. A. Feoktistova, E. V. Sulдина, A. V. Mastilenko, A. K. Bekkalieva // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2021. – 723. – P. 022084. - doi:10.1088/1755-1315/723/2/022084.

7. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии : обзор / О. С. Антонова, Н. А. Корнева, Ю. В. Белов [и др.] // Научное приборостроение. - 2010. - Т. 20, № 1. - С. 3-9.

8. Tan, S. C. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present / S. C. Tan, B. C. Yip // J. Biomed. Biotechnol. - 2009. - Vol. 2009. – P. 574398. - DOI: 10.1155/2009/574398

9. Moore, D. D. Isolation and purification of large DNA restriction fragments from agarose gels / D. D. Moore, J. Chory, R. K. Ribaud // Current Protocols in Immunology. - 1993. - Vol. 8, is. 1. - P. 1051-10512.

10. Определение оптимальной методики экстракции днк бактериофагов *Pseudomonas syringae* / Н. А. Феоктистова, Е. В. Сульдина, А. В. Мастиленко, Д. А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения : материалы XI Международной научно-практической конфе-

ренции. – Ульяновск, 2021. – С. 157-164.

11. Development of giant bacteriophage phiKZ is independent of the host transcription apparatus / P. J. Ceysens, L. Minakhin, A. van den Bossche, M. Yakunina, E. Klimuk, B. Blasdel, J. de Smet, J. P. Noben, U. Bläsi, K. Severinov, R. Lavigne // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – P. 10501-10510.

12. Бактериофаги: биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе ; научный редактор А. В. Летаров ; перевод с ан-

глийского Е. Е. Куликов [и др.]. – Москва : Научный мир, 2012. – 636 с. – ISBN 978-5-91522-284-6.

13. Золотухин, С. Н. Молекулярно-генетические исследования по изучению генома новых бактериофагов / С. Н. Золотухин, Д. А. Васильев // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. – 2010. – № 1(11). – С. 65-68.

14. Ackermann, H. W. Phage classification and characterization / H. W. Ackermann // *Methods Mol Biol*. – 2009. – Vol. 501. – P. 127-140.

SPECIFICATION OF SIZE OF NUCLEIC ACIDS OF PS.S-7 ULGAU AND PS.S-27 ULGAU BACTERIOPHAGES

Feoktistova N.A., Suldina E.V., Masilenko A.V., Abdurakhmanov I.M.
FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1; 8 (8422) 55-95-47; e-mail: feokna@yandex.ru

Keywords: *Pseudomonas syringae*, nucleic acids, size, bacteriophages, DNA, method, extraction

The article presents results of studies on specification of the size of nucleic acids of Ps.s-7 ULGAU and Ps.s-27 ULGAU bacteriophages. The relevance of the research on classification of bacteriophages by type and size of nucleic acid is substantiated in the introduction of the article. It was established, by the method of extraction on magnetic particles and phenol-chloroform extraction, that the maximum calculated size for the DNA of Ps.s-7 ULGAU bacteriophage (isolated from a soil sample, characteristics: lytic activity, determined by the Graciov method, $-2.0 \pm 0.1 \times 10^9$ pfu / ml, by Appelman's method - 10^8 , drip test - n^3 ; spectrum of lytic action - 85.7%) was 38137 bp, for Ps.s-27 ULGAU bacteriophage (isolated from a soil sample, characteristics: $1.0 \pm 0.1 \times 10^9$ pfu / ml according to Grazio, according to Appelman - 10^8 , drop test - n^3 ; spectrum of lytic action was 85.7%) DNA size was 23744 bp. The studies used a DNA molecular weight marker Quick-Load Extend DNA 500-48500 bp, a Nanodrop 2000 / 2000c spectrophotometer (ThermoFisher), and a PAGE electrophoresis technique. The obtained data will make it possible to specify the phylogenetic relationship of Ps.s-7 ULGAU and Ps.s-27 ULGAU bacteriophages with bacteriophages annotated in the NCBI database, using Protein BLAST, active against phytopathogenic *Pseudomonas syringae* bacteria, causing tumor neoplasms, rotting, growth cessation and death of a part of plants cultivated by humans without decay, chlorosis, necrosis, etc.

Bibliography:

1. Miroshnikov, K.A. Genomics and proteomics of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages: spec. 03.01.04; 03.01.06: Author's abstract of dissertation for the degree of Doctor of Chemical Sciences / Miroshnikov Konstantin Anatolievich; Moscow State University named after M.V. Lomonosov. - Moscow, 2013. - 169 p.
2. Clokie, Martha R. J. Bacteriophages. Methods and Protocols. Volume 3 / Martha R. J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. - Humana Press, 2018. - 311 p.
3. Molecular biological and genetic principles of selection of therapeutic bacteriophages of bacteria of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* genera / K. A. Miroshnikov, E. E. Kulikov, O.S. Darbeeva, K. A. Lysko, G. M. Ignatiev // *Applied Biochemistry and microbiology*. - 2014. - V. 50, №3. - P. 338.
4. Ackermann, H. W. Bacteriophage taxonomy / H. W. Ackermann // *Microbiology Australia*. - 2011. - Vol. - P. 5.
5. Development of the scheme of isolation and bacteriological identification of *Pseudomonas syringae* bacteria and its approbation / N. A. Feoktistova, A. K. Bekkaliyeva, D. A. Vasiliev, E. V. Suldina // *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. - 2021. - №2 (54). - P. 148-156.
6. Bacteriophages of *Pseudomonas syringae*: features of isolation and study of main biological properties / D. A. Vasiliev, N. A. Feoktistova, E. V. Suldina, A. V. Mastilenko, A. K. Bekkaliyeva // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. - 2021. - 723. - P. 022084. — doi: 10.1088/1755-1315/723/2/022084.
7. Effective methods for isolation of nucleic acids for analysis in molecular biology: a review / O.S. Antonova, N.A. Korneva, Yu. V. Belov [et al.] // *Scientific instrument making*. - 2010. - V. 20, №1. - P. 3-9.
8. Tan, S. C. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present / S. C. Tan, B. C. Yip // *J. Biomed. Biotechnol*. - 2009. - Vol. 2009. - P. 574398. — DOI: 10.1155/2009/574398
9. Moore, D. D. Isolation and purification of large DNA restriction fragments from agarose gels / D. D. Moore, J. Chory, R. K. Ribaud // *Current Protocols in Immunology*. - 1993. - Vol. 8, is. 1. - P. 1051-10512.
10. Specification of appropriate technique for DNA extraction of *Pseudomonas syringae* bacteriophages / N. A. Feoktistova, E. V. Suldina, A. V. Mastilenko, D. A. Vasiliev // *Agrarian science and education at the present stage of development: experience, problems and solutions: materials of the XI International Scientific and Practical Conference*. - Ulyanovsk, 2021. - P. 157-164.
11. Development of giant bacteriophage phiKZ is independent of the host transcription apparatus / PJ Ceysens, L. Minakhin, A. van den Bossche, M. Yakunina, E. Klimuk, B. Blasdel, J. de Smet, JP Noben, U. Bläsi, K. Severinov, R. Lavigne // *Journal of Virology*. - 2014. - Vol. 88. - P. 10501-10510.
12. Bacteriophages: biology and practical application / E. Cutter, A. Sulakvelidze; scientific editor A. V. Letarov; translation from English by E.E. Kulikov [and others]. - Moscow: Nauchnyi mir, 2012. - 636 p. - ISBN 978-5-91522-284-6.
13. Zolotukhin, S. N. Molecular genetic studies of the genome of new bacteriophages / S. N. Zolotukhin, D. A. Vasiliev // *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. - 2010. - №1 (11). - P. 65-68.
14. Ackermann, H. W. Phage classification and characterization / H. W. Ackermann // *Methods Mol Biol*. - 2009. - Vol. 501. - P. 127-140.