

Автор:

Слепцова Светлана Владимировна

ученица 10 «В» класса

Руководитель:

Макарова Елена Владимировна

МОБУ «Якутский городской лицей»

г. Якутск, Республика Саха (Якутия)

Трансформация бактерий

Актуальность: трансформация бактерий является интересным процессом, нам необходимо знать о продвижении генной инженерии в данной области

Цели: использование безвредных и доступных бактерий в трансформации

Задачи:

1. Узнать о трансформации бактерий

2. Провести трансформацию кишечной палочки, молочнокислых бактерий кефира и уксуснокислых бактерий капустного рассола

3. Сравнить возможные трансформации и сделать выводы

Трансформация была открыта в 1928 году, когда британский учёный Ф. Гриффит показал возможность превращения непатогенных штаммов в патогенные, в результате взаимодействия с убитыми клетками патогенных штаммов.

Зелёный флуоресцентный белок был выделен вместе с другим светящимся белком экворином из медузы *Aequorea victoria* Осamu Симомурой.

В настоящее время зеленый флуоресцентный белок ученые присоединяют к другим белкам, а затем выясняют их местоположение благодаря флуоресценции. Таким образом, они могут наблюдать за ростом раковых опухолей, как влияет на мозг болезнь Альцгеймера, каким образом растут в организме бактерии, вызывающие заболевания, а так же многие другие процессы внутри живых организмов.

В нашей школе мы провели опыт трансформации бактерий. Для опыта необходимо подготовить питательную среду для выращивания бактериальных культур.

Ампициллин и арабинозу переносятся сухими в маленьких пробирках. После регидратации их добавляют в жидкую среду, ампициллин – антибиотик ингибирует рост бактериальной грязи, которая может быть занесена из окружающей среды. Арабиноза – сахар, вызывает получение зеленого флуоресцентного белка в больших размерах в клетках. Антибиотик позволяет определить прошла трансформация или нет. Если трансформация получится, то в бактерии будет плазмида с геном устойчивости к антибиотику ампициллину, и они вырастут в чашке Петри.

При помощи стерильной пипетки добавляем 3мл буферного раствора прямо в пробирку с ампициллином. Другой стерильной пипеткой добавляем 3мл буфера в арабинозу для регидратации. Осторожно помешиваем.

Для приготовления жидкой среды, в 250 мл стакан добавляем 55 мл дистиллированной воды и нагреваем до кипения в микроволновой печи, затем добавляем капсулу LB в стакан. Нагреваем его снова до кипения в микроволновой печи. Повторяем процедуру (нагревание и вращение) несколько раз до полного растворения таблетки.

Когда таблетка полностью растворится, даем среде остывть так, чтобы можно было удобно держать. Пока среда остывает, достаем раствор ампициллина и арабинозы. Когда среда остынет, новой пипеткой переносим 0.5 мл арабинозы и 0.5 мл ампициллина в стакан.

Реальная процедура трансформации включает множество этапов по подготовке вставляемого гена, вставки гена в плазмиду и трансформацию бактерии этой плазмидой. Мы же использовали готовую плазмиду, и ничего в нее не вставляли. В плазмиде уже есть ген устойчивости к антибиотику ампициллину.

Необходимо отделить клетки, несущие новый ген, от массы исходных клеток. Для отделения клеток, прошедших трансформацию от

нетрансформированных, культивирование ведут на средах, содержащих антибиотики. В том случае, если плазмидный вектор содержит ген устойчивости к антибиотику, и он попал в бактерию, то начнет вырабатываться белок разрушающий антибиотик и бактерия не умрет.

Для трансформации используются специальные лабораторные штаммы кишечной палочки. Эти штаммы специально модифицированы, в них, например, нет рестриктаз, которые разрезали бы чужую ДНК, проникшую в бактерию.

E. coli относится к микроорганизмам, не обладающим естественной компетентностью к поглощению ДНК. Поэтому необходимо придать ей компетентность перед трансформацией.

В процессе теплового шока (нагревание до 42°C) плазмиды проникают через поры в мембране. Тепловой шок не придает клеткам компетентность, а лишь помогает ДНК пройти через мембрану.

Затем в две пробирки добавляем по 250 мкл раствора для трансформации (CaCl_2), плазмиду и сами бактерии. Подвергаем тепловому шоку для того, чтобы клеточная стенка бактерий ослабла, и зеленый флуоресцентный белок проник в клетки бактерий.

Сначала ставим пробирки с плазмидой, антибиотиком и бактериями в лед на 10 минут, а затем на 50 секунд в воду 42 °C. Далее с помощью стерильной петли наносим на среду.

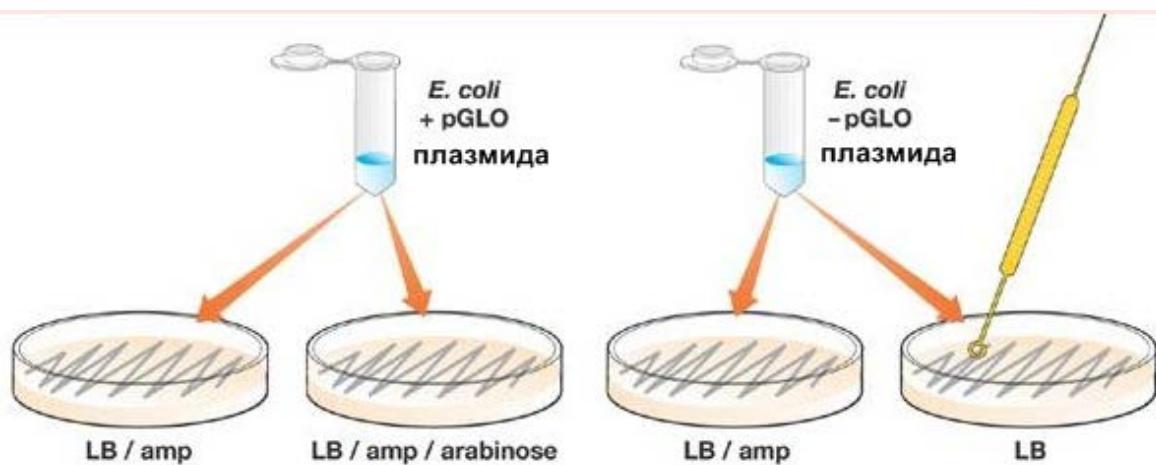


Рис. 1. Распространение бактериальной суспензии на среду



Рис. 2. Результат работы

В результате должны появиться много белых точек - колоний бактерий. Каждая колония является потомством одной единственной трансформированной бактерии, попавшей в чашку.

Обсуждение результатов

Опыт проводился многократно, и результат получался разный. Бактерии кишечной палочки успешно прошли трансформацию, они выросли на среде и обладали зеленым свечением при попадании ультрафиолетовых лучей на них. Бактерии кефира же не обладали свечением, но выросли на среде. Это можно объяснить тем, что бактерии кефира устойчивы к антибиотику, содержащемуся в среде или прошла частичная трансформация. Бактерии капустного рассола прошли полную успешную трансформацию и обладали свечением, но выросла лишь одна колония. Опыты необходимо повторять, для более точных результатов.

Выводы

- 1) Трансформация прошла успешно с бактериями кишечной палочки и уксуснокислыми бактериями.
- 2) Молочнокислые бактерии не обладали свечением, но выросли на среде.
- 3) Наиболее безопасно использовать уксуснокислые бактерии для трансформации.

Список литературы

1. И.Ф. Жимулев, «Общая и молекулярная генетика», издательство Новосибирского Университета, Новосибирск, 2002.
2. В.Н. Ярыгин, «Биология. Жизнь. Гены. Клетка. Онтогенез. Человек», «Высшая школа», Москва, 2001.

3. Е.Н. Мииустин, В.Т.Емцев, «Микробиология», «Агропромиздат», Москва, 1987.
4. Н.А. Колтовая, «Практикум по молекулярной биологии Н.А.Колтовой»
5. Электронный ресурс: <http://www.genetics.timacad.ru/Gazeta/Transform.htm>
6. Электронный ресурс: <http://ftp.ssmu.ru/ofice/f4/micro/guide/Content/genetics/Gen5.html>
7. Электронный ресурс: http://polit.ru/news/2013/05/17/ps_belousov/
8. Электронный ресурс: <http://ru.wikipedia.org/>
9. Электронный ресурс: <http://www.facepla.net/index.php/the-news/nature-news-mnu/2259-animal-lights>.
10. Электронный ресурс: <http://ria.ru/science/20090427/169395850.html#ixzz2vf40QIt7>.