

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* Осаму 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 плазида 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 остыть 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 раствор 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.

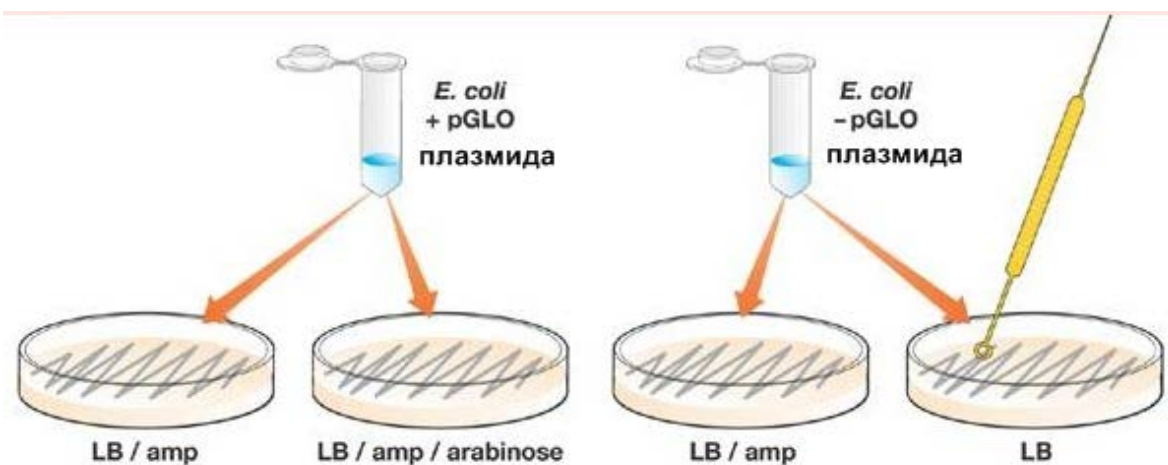


Рис. 1. Распространение бактериальной суспензии на среду



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, содержащимся 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. Мишустин, 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>.