

**Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей
среды**

Секция: Микология, микробиология и низшие растения

Бизина Дарина Викторовна

**Возможность и эффективность трансформации бактерий
Escherichia coli и *Bacillus brevis* методом теплового шока**

*МБОУ «Биотехнологический лицей №21», наукоград Кольцово,
Новосибирская область,
9 класс*

Научный руководитель: Рюкбейль Дмитрий Александрович

Содержание

Введение.....	3
Литературный обзор	3
Методика работы	4
Возможность и эффективность трансформации бактерий <i>Escherichia coli</i> и <i>Bacillus brevis</i> методом теплового шока.....	7
Основные методы трансформации бактерий.....	7
Оценка возможности трансформации бактерий <i>Escherichia coli</i> и <i>Bacillus brevis</i> методом теплового шока	7
Оценка эффективности трансформации бактерий <i>Escherichia coli</i> при разной продолжительности теплового шока	8
Выводы.....	9
Библиографический список	10

Введение

Мы живем в наукограде Кольцово, который широко известен за счет градообразующего предприятия Института вирусологии и биотехнологий «Вектор». Таким образом, исторически сложилось, что наш городок привлекателен для предприятий именно биохимической направленности. Сейчас Кольцово активно развивается, на его территории имеются и постоянно появляются предприятия, специализирующиеся на биотехнологиях.

Разумеется, это накладывает отпечаток на сферу интересов нас, школьников. Хочется иметь более подробную информацию о том, чем можно заниматься в данной области, как происходят те или иные процессы, какие инструменты при этом используются.

Данная работа связана с изучением технологии внедрения генов одного организма в другой организм. Это можно наглядно показать на примере трансформации бактерий, что и использовалось в данной работе.

Трансформация бактерий может быть использована в медицине. Например для людей, страдающих сахарным диабетом. Таким людям нужны инъекции с инсулином, но для достаточно большого количества людей инсулина слишком мало. Именно здесь можно применить трансформацию. В качестве основы можно использовать идентичную по строению клетку, в которую будит внедряться ген инсулина. После такая инъекция из трансформированных клеток будет вводиться человеку.

Мы трансформировали бактерии *Escherichia coli*. В работе использовался её безопасный штамм (HB101 K-12). Но, учитывая, что это исключение, а в общем случае бактерия *Escherichia coli* занесена в список опасных микроорганизмов, с которыми дети не могут работать, мы попытались найти альтернативу. В качестве возможной альтернативы мы решили попробовать провести трансформацию безопасной бактерии *Bacillus brevis* тем же методом, который применяется для *E. coli*. Кроме того в данной работе оценивалась эффективность трансформации *E. coli* в зависимости от времени воздействия теплового шока.

Литературный обзор

Плазмида pGLO содержит ген GFP и ген устойчивости к антибиотику ампициллину. Также эта плазмида содержит специальную систему регуляции работы генов, с помощью которой можно контролировать экспрессию белка в трансформированных клетках. Чтобы «включить» ген GFP, нужно всего лишь добавить сахар арабинозу в питательную среду, на которой растут клетки. Отбор бактерий, получивших ДНК pGLO, ведется с помощью высевания на среду, содержащую антибиотик – ампициллин. Трансформированные клетки вырастают в виде белых колоний на чашках, не содержащих арабинозу, и в виде зеленых – на чашках, где в среду была добавлена арабиноза.

Целью данной работы являлось установить возможность трансформации бактерий *Escherichia coli* и *Bacillus brevis* плазмидой pGLO методом теплового шока и оценить эффективность трансформации в зависимости от продолжительности теплового шока.

Исследовательские задачи:

- 1) познакомиться с основными методами трансформации бактерий;
- 2) выбрать метод трансформации бактерий для проведения опыта и подготовить необходимые реактивы и материалы;
- 3) экспериментально установить возможность трансформации методом теплового шока бактерий *Escherichia coli* и *Bacillus brevis*;
- 4) оценить эффективность трансформации бактерий методом теплового шока при разной продолжительности времени его воздействия.

Методика работы

Для изучения основных методов трансформации была проанализирована информация, взятая из следующих статей, размещенных в сети Интернет:

- 1) «Трансформация *E. coli*» [1];
- 2) «Холодовой шок у бактерий» [2];
- 3) «Трансформация (генетика)» [3];
- 4) «Трансформация» [4].

Для проведения эксперимента по трансформации бактерий использовались методика и реактивы из имеющегося в лаборатории МБУДО «Созвездие» образовательного набора фирмы BIO RAD по трансформации бактерий «pGLO Bacterial Transformation Kit».

Основные этапы подготовки и выполнения эксперимента по трансформации бактерий *Escherichia coli* и *Bacillus brevis* описаны ниже.

Этап 1. Приготовление питательной среды на основе LB-агара.

Для приготовления питательной среды использовались 250 мл воды и сухой LB-агар. Агар растворялся в указанном объеме воды, после чего полученный раствор стерилизовался в микроволновой печи путем неоднократного кипячения.

Этап 2. Приготовление раствора ампициллина и арабинозы.

Данные растворы необходимы для установления факта трансформации исходных бактерий. Для приготовления указанных растворов использовались компоненты, входящие в набор «pGLO Bacterial Transformation Kit»: по 3 мл трансформационного раствора добавлялись во флаконы с ампициллином и арабинозой.

Этап 3. Заливка чашек Петри подготовленной питательной средой.

Чашки, с надписью «LB» заливались LB-агаром.

К оставшемуся агару добавлялся раствор ампициллина и среда перемешивалась. Полученная питательная среда, содержащая ампициллин, заливалась в чашки, подписанные «LB/amp».

В оставшуюся среду добавляется раствор арабинозы, раствор тщательно перемешивался и заливался в чашки, с надписью «LB/amp/ara».

Все чашки оставались на 2 суток для затвердевания среды.

Все указанные работы проводились в ламинарном боксе, установленном в лаборатории МБУДО «Созвездие».

Этап 4. Приготовление плазмиды pGLO.

Во флакон с порошком плазмиды pGLO добавлялось 250 мкл трансформационного раствора и флакон встряхивался.

Этап 5. Эксперимент по трансформации бактерий *Vacillus brevis* и *Escherichia coli* методом теплового шока.

Ход эксперимента по трансформации бактерий описан ниже.

1. Для проведения работы были взяты две «стартовые» чашки с исходными колониями бактерий *Vacillus brevis* и *Escherichia coli*.
2. Были взяты по две микропробирки с маркировкой +pGLO и -pGLO. Пробирки, с надписью «-pGLO» были взяты как контроль.
3. Пробирки с надписями «+pGLO» и «-pGLO» заполнялись трансформационным раствором (CaCl_2) до объема 250 мкл. Далее они ставились в снег на 1 минуту.
4. С помощью стерильной микробиологической петли бралась одна колония с одной из «стартовых» чашек (рисунок 1). Колония бактерий добавлялась в одну из пробирок и тщательно размешивалась (рисунок 2). Аналогично поступали со второй «стартовой» чашкой.



Рис.1. Взятие колонии бактерий из стартовой чашки



Рис. 2. Размешивание колонии

5. В каждую из пробирок «+pGLO» добавляли раствор плазмиды. В пробирки «-pGLO» раствор плазмиды не добавлялся. После микропробирки ставили в снег на несколько минут.
6. Через несколько минут все микропробирки одновременно ставились в твердотельный термостат для микропробирок, с температурой 42°C ровно на 50 секунд. Потом пробирки так же быстро переставлялись на снег, на котором они находились две минуты.
7. После теплового шока в микропробирки добавлялось по 250 мкл питательной среды LB.
8. Для оценки результата трансформации по 100 мкл суспензии из каждой микропробирки с помощью автоматического дозатора наносилось на соответствующие чашки с питательной средой и равномерно размазывалось стерильной микробиологической петлей по поверхности среды (рисунок 3).



Рис. 3. Нанесение суспензии на чашки со средой

9. Все бактериальные посевы инкубировались в лабораторном термостате при 32°C в течение 2 суток. Далее оценивался результат трансформации и подсчитывалась ее эффективность.

Для оценки эффективности трансформации бактерий *Escherichia coli* в зависимости от времени воздействия теплового шока. Вся процедура по их трансформации осуществлялась по описанной ранее схеме за исключением времени нахождения суспензии бактерий в твердотельном термостате: было установлено три продолжительности воздействия – 40, 50 и 60 секунд. Посев бактерий из каждой экспериментальной пробирки производился на три чашки Петри и эффективность трансформации в каждой экспериментальной группе оценивалась по средним значениям, вычисленным из трех показателей.

Возможность и эффективность трансформации бактерий *Escherichia coli* и *Bacillus brevis* методом теплового шока

Основные методы трансформации бактерий

В результате изучения методов трансформации бактерий было выяснено, что есть несколько основных способов:

- 1) Метод электропорации [1] (проникновение ДНК в бактериальную клетку под действием электрического поля при высоком напряжении в течение короткого времени);
- 2) Химическая трансформация [1] (получение компетентных клеток и трансформация за счет воздействия определенных реагентов);
- 3) Метод теплового шока [2] (трансформация при воздействии на бактерии разных контрастных температур).

Оценка возможности трансформации бактерий *Escherichia coli* и *Bacillus brevis* методом теплового шока

В результате первого эксперимента были получены следующие результаты:

1. Бактерия *Bacillus brevis* выросла только на питательной среде, в которой нет ни ампициллина, ни арабинозы (рисунок 4). На среде с добавлением ампициллина и арабинозы колонии бактерий не выросли (рисунок 5,6,7).



Рис.4. Bacillus brevis -pGLO LB

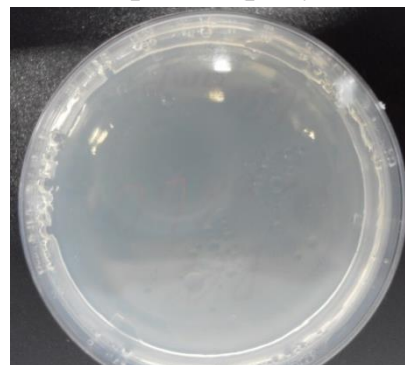


Рис.5. Bacillus brevis -pGLO LB+amp

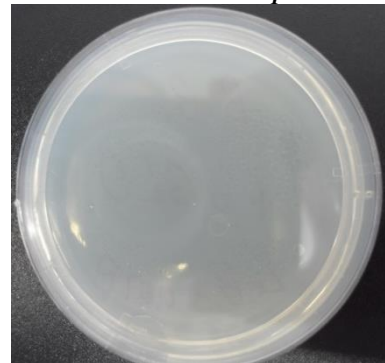


Рис.6. Bacillus brevis +pGLO LB+amp



Рис.7. Bacillus brevis +pGLO LB+amp+ara

2. Бактерия *Escherichia coli* выросла везде, кроме чашки, в которой находилась среда с ампициллином (рисунок 9), куда производился контрольный посев (бактерии без трансформации). В среде с арабинозой и ампициллином четко видны колонии бактерий (рисунок 11), как и в среде с ампициллином (рисунок 10). На чистой среде вырос бактериальный газон (рисунок 8).



Рис.8. Escherichia coli –pGLO LB

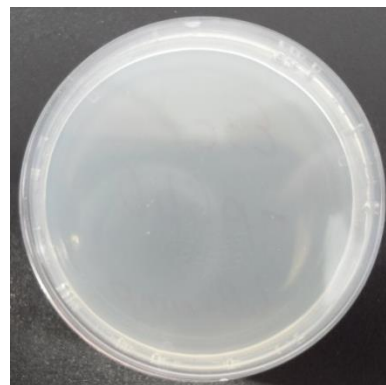


Рис.9. Escherichia coli –pGLO LB+amp



Рис.10. Escherichia coli +pGLO LB+amp

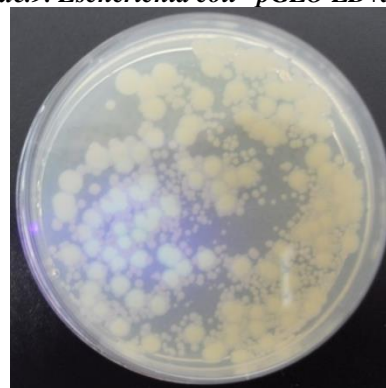


Рис.11. Escherichia coli +pGLO LB+amp+ara

Полученные в эксперименте данные показали, что метод теплового шока эффективен для трансформации бактерий *Escherichia coli* и абсолютно не работает для бактерий *Vacillus brevis*.

Оценка эффективности трансформации бактерий *Escherichia coli* при разной продолжительности теплового шока

Трансформация *Escherichia coli* дала положительные результаты, вследствие чего мы решили проверить на ней эффективность трансформации при различной продолжительности теплового шока.

После проведения эксперимента были выведены следующие результаты:

1. Среднее количество колоний трансформировавшихся бактерий составило:
 - 33 колонии при длительности теплового шока 40 секунд;

- 19 колоний при длительности теплового шока 50 секунд;
- 34 колонии при длительности теплового шока 60 секунд.

2. Эффективность трансформации составила:

- 206,25 клеток на 1мкг ДНК при длительности теплового шока 40 секунд;
- 118,75 клеток на 1мкг ДНК при длительности теплового шока 50 секунд;
- 212,5 клеток на 1мкг ДНК при длительности теплового шока 60 секунд.

По данным, полученным в результате эксперимента видно, что наиболее эффективная трансформация происходит при продолжительности теплового шока в 60 и 40 секунд (рисунок 12).

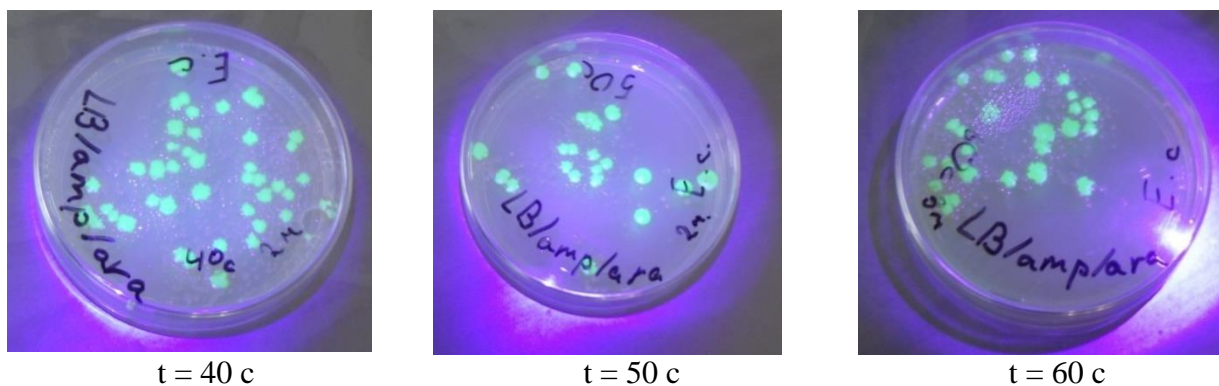


Рис. 12. Эффективность трансформации бактерий *Escherichia coli* при разной продолжительности теплового шока

Выводы

В результате проведенной экспериментальной работы установлено, что метод трансформации бактерий методом теплового шока является эффективным для *Escherichia coli*, но совершенно не подходит для *Bacillus brevis*.

Так же установлено, что для более эффективной трансформации бактерии *Escherichia coli* тепловым шоком лучше использовать продолжительность 40 или 60 секунд.

Библиографический список

- 1) Трансформация E.coli - Мои Лекции.ру [Электронный ресурс] // URL: <http://mylektsii.ru/6-18836.html>
- 2) Баснакьян И.А. Стресс у бактерий. – М.: Медицина, 2003, 136 с. - Большая онлайн библиотека e-Reading [Электронный ресурс] // URL: http://www.e-reading.club/djvureader.php/140067/Basnak'yan_-_Stress_u_bakteriii.html
- 3) Трансформация (генетика) – Википедия [Электронный ресурс] // 21 ноября 2018 в 17:17; URL: [https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%81%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_\(%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B0\)](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%81%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_(%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B0))
- 4) Трансформация – XuMuK.ru - САЙТ О ХИМИИ [Электронный ресурс] // URL: <http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2/4543.html>